

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Erki Aun

**K-meeridel põhinev antibiootikumiresistentsuse markerite tuvastamine bakteris
*Pseudomonas aeruginosa***

Magistritöö
Geenitehnoloogia
30 EAP

Juhendaja PhD Age Brauer

TARTU 2017

INFOLEHT

K-meeridel põhinev antibiootikumiresistentsuse markerite tuvastamine bakteris

Pseudomonas aeruginosa

Antibiootikumide kasutamist on piiranud nende kasutusele võtmisele järgnenud kiire resistentsuse ilmumine bakterite seas. Resistentsete bakterite vastu võitlemisel on oluline identifitseerida bakterites uusi resistentsust põhjustavaid geene ja mutatsioone. Need teadmised võimaldavad näiteks disainida uusi kiireid DNA põhiseid teste resistentsete fenotüüpide tuvastamiseks ja optimeerida antibiootikumikuure.

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates tutvustatakse resistentsust, selle levikut, mehhanisme ja muid aspekte. Praktilises osas loodi k-meeridel põhinev töövoog, mille abil tuvastati *P. aeruginosa* genoomist nii varem teadaolevaid kui potentsiaalseid uusi resistentsusega seotud markereid.

Märksõnad: antibiootikumiresistentsus, genoomsed markerid, *k*-meerid, *Pseudomonas aeruginosa*

CERCS: B110 Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika.

K-mer-based detection of antibiotic resistance markers in bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

The use of antibiotics has been limited by fast emergence of resistance in bacteria after introducing them. To counteract resistant bacteria, it is important to identify new resistance-associated mutations and genes. This knowledge enables us, for example, to design new DNA based assays for detecting resistance phenotype and optimize the antibiotic therapies.

Literature review of this thesis describes spread, mechanisms and other aspects of resistance. In the practical part the k-mer-based resistance marker detection pipeline was designed. Applying this pipeline to *P. aeruginosa* discovered some well-known and some potential new resistance associated markers.

Keywords: antibiotic resistance, genomic markers, *k*-mers, *Pseudomonas aeruginosa*

CERCS: B110 Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics.

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSUS, LEVIK JA MEHHAANISMID.....	7
1.1.1 Antibiootikumiresistentsuse ülevaade.....	7
1.1.2 Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid.....	9
1.1.2.1 Antibiootikumi rakusisese kontsentratsiooni vähendamine.....	11
1.1.2.2 Antibiootikumi sihtmärgi modifitseerimine ja selle kaitsmine antibiootikumide toime eest.....	12
1.1.2.3 Antibiootikumi modifitseerimine ja hüdroolüüsimine	13
1.1.2.4 Bakteri kohanemine antibiootikumi olemasoluga	14
1.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	15
1.2.1 Pseudomonas aeruginosa ülevaade.....	15
1.2.2 Pseudomonas aeruginosa infektsioonide raviks kasutatavad antibiootikumid.....	16
1.2.3 Resistentsus Pseudomonas aeruginosa-s.....	17
1.3 ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSUSE HINDAMINE.....	22
1.4 ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSUSMARKERITE TUVASTAMINE.....	24
1.5 K-MEERID JA NEIL PÕHINEVAD RESISTENTSUSMARKERITE TUVASTAMISE TARKVARAD.....	26
1.5.1 K-meerid.....	26
1.5.2 SEER.....	27
1.5.3 Kover.....	27
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	29
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	29
2.2 MATERJAL JA METOODIKA	29
2.2.1 Lähteandmed	29
2.2.2 Töövoog antibiootikumiresistentsuse markerite leidmiseks bakterite genoomidest	30
2.2.2.1 K-meeri listide koostamine.....	31
2.2.2.2 K-meeridele spetsiifiliste Welch-i t-testide arvutamine ning k-meeride filtreerimine testi tulemuste alusel.....	31
2.2.2.3 Järjestikuste k-meeride grupeerimine.....	33
2.2.2.4 K-meeride annoteerimine	33
2.2.2.5 Väljundtabeli tekitamine.....	34
2.2.2.6 Tulemuste sorteerimine ja kirjeldamine	34
2.2.3 Fülogeneetilise puu loomine.....	34
2.3 TULEMUSED.....	36
2.3.1 K-meeride filtreerimine	37
2.3.2 Tsiprofloksatsiiniresistentsuse genoomsed markerid.....	37
2.3.2.1 Mutatsioonid DNA topoisomeraas IV subühik A (parC) geenis	39
2.3.2.2 Mutatsioon DNA güraasi subühik A (gyrA) geenis	40
2.3.3 Imipeneemiresistentsuse genoomsed markerid	41
2.3.3.1 Mutatsioon transkriptsiooniregulaatori geenis.....	41
2.3.3.2 Mutatsioon LysR perekonna transkriptsiooniregulaatori geenis	42
2.3.3.3 Mutatsioonid välismembraani poriini oprD geenis	43
2.3.4 Tobramütsiini- ja gentamütsiiniresistentsuse genoomsed markerid.....	44
2.3.4.1 Integrini omavate tüvede resistentsus tobramütsiinile.....	45
2.3.4.2 Integrini omavate tüvede resistentsus gentamütsiinile.....	46
2.3.5 Multiresistentsust põhjustav mutatsioon nalC-s.....	46
2.4 ARUTELU	47
KOKKUVÕTE.....	52
SUMMARY.....	53
TÄNUAVALDUSED	54

KIRJANDUSE LOETELU.....	55
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	64
LISAD	65
LISA 1 FÜLOGENEETILINE PUU	65
LIHTLITSENTS.....	67

KASUTATUD LÜHENDID

AAC	- aminoglükosiid atsetüültrasferaas (ingl. k. <i>aminoglycoside acetyltransferase</i>)
ABC	- ATP-siduv kassett perekond (ingl. k. <i>ATP-binding cassette family</i>)
ah	- aminohape
ANT	- aminoglükosiid nukleotidüültrasferaas (ingl. k. <i>aminoglycoside nucleotidyltransferase</i>)
APH	- aminoglükosiid fosfotrasferaas (ingl. k. <i>aminoglycoside phosphotransferase</i>)
AST	- antimikroobse tundlikkuse hindamine (ingl. k. <i>antimicrobial susceptibility testing</i>)
c.	- kodeeriv järjestus (ingl. k. <i>coding sequence</i>)
Cre	- süsinikuallikatundlik (ingl. k. <i>carbon source responsive</i>)
dacB	- D-alanüül-D-alaniin karboksüpeptidaas B (ingl. k. <i>d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase</i>)
DAP	- daptomüsiin
EUCAST	- Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Euroopa Komitee (ingl. k. <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
GWAS	- ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (ingl. k. <i>genome-wide association study</i>)
Gyr	- güraasi subühik
HGT	- horisontaalne geeniuülekand (ingl. k. <i>horizontal gene transfer</i>)
IMP-18	- imipenemaas metallo- β -laktamaas 18
ins	- insertsioon
Lia	- lipiid II tsükkel-interfereerivate antibiootikumide valk (ingl. k. <i>lipid II cycle-interfering antibiotics protein</i>)
MATE	- multiravimi ja toksiliste ühendite väljavooluperekond (ingl. k. <i>multidrug and toxic compound extrusion family</i>)
MCR-1	- mobiliseeritud kolistiiniresistentsus 1 (ingl. k. <i>mobilized colistin resistance 1</i>)
MDR	- multiravimiresistentsus (ingl. k. <i>multi drug resistance</i>)
Mex	- mitmene väljavool (ingl. k. <i>multiple efflux</i>)
MFS	- peamine abistaja superperekond (ingl. k. <i>major facilitator superfamily</i>)
MGE	- mobiilne geneetiline element
MIC	- minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (ingl. k. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MRSA	- metitsilliiniresistentne <i>Staphylococcus aureus</i> (ingl. k. <i>methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>)
Opr	- välismembraani poriin (ingl. k. <i>outer membrane porin</i>)
ORF	- avatud lugemisraam (ingl. k. <i>open reading frame</i>)
Par	- jagunemisvalk, topoisomeraas IV subühik (ingl. k. <i>partition protein, topoisomerase subunit</i>)
PBP	- penitsilliini siduv valk (ingl. k. <i>penicillin binding protein</i>)
Rmt	- 16S rRNA metüültrasferaas
RND	- resistentsus-nodulatsioon-rakujagunemise perekond (ingl. k. <i>resistance nodulation cell division</i>)
SMR	- väike multiravimiresistentsuse perekond (ingl. k. <i>small multiresistance family</i>)
VISA	- vankomüsiinile keskmiselt resistentne <i>Staphylococcus aureus</i> (ingl. k. <i>vancomycin intermediate Staphylococcus aureus</i>)
WGS	- kogugenoomi sekveneerimine (ingl. k. <i>whole genome sequencing</i>)
WHO	- Maailma Terviseorganisatsioon (ingl. k. <i>World Health Organisation</i>)

SISSEJUHATUS

Bakteriaalsed nakkushaigused on läbi inimkonna ajaloo olnud ühed olulisemad suremuse ja haigestumise põhjustajad. Õnneks avastati 20. sajandi alguses spetsiifiliselt bakterite kasvu inhibeerivad antibiootikumid, mis võimaldasid bakteriaalseid infektsioone edukalt ennetada ja ravida. Lisaks sellele, et antibiootikumid võimaldasid päästa tõsiste bakterinakkustega patsientide elusid, võimaldasid nad sooritada keerukamaid kirurgilisi operatsioone ning arendada ka muid meditsiinivaldkondi. Antibiootikume peeti tõeliseks imeravimiks. Inimeste eluiga tõusis ning usuti, et bakteriaalsed nakkushaigused on võidetud.

Antibiootikumidest suuremakski bioloogiliseks imeks võib aga pidada nende kasutusele võtmisele järgnenud kiiret resistentsuse ilmutist bakterite seas. See on tänaseks päevaks kaasa toonud resistentsuse kõikide kasutusele võetud antibiootikumide suhtes ning leidub bakteritüvesid, mis ei allu ravile ühegi antibiootikumiga. Samas on uute antibiootikumide välja töötamine pidurdunud erinevate majanduslike ja regulatoorsete põhjuste tõttu. Maailma Terviseorganisatsioon on nimetanud antibiootikumiresistentsust üheks suuremaks ohuks inimkonna tervisele ning hoiatanud, et 21. sajandil võib inimkond jõuda post-antibiootilisse ajajärku. Kirjeldatud olukorras on oluline leida paremaid vahendeid, et võidelda resistentsete bakterite leviku ja nende tekitatud infektsioonide vastu. Üks viis selleks on identifitseerida bakterites uusi resistentsust põhjustavaid geene ja mutatsioone, mis võimaldaksid paremini mõista bakteri resistentsusmehhanisme, kontrollida efektiivsemalt infektsioonide levikut, disainida uusi kiireid DNA põhiseid teste resistentsete fenotüüpide tuvastamiseks ja optimeerida antibiootikumikuure.

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates tutvustatakse resistentsust, selle levikut, mehhanisme ja muid aspekte ning tehakse ülevaade Maailma Terviseorganisatsiooni poolt resistentsuse seisukohalt üheks ohtlikumaks bakteriks nimetatud *Pseudomonas aeruginosa*-st, kes on tuntud keerukate resistentsusmehhanismide, multiresistentsuse ja võime poolest arendada välja resistentsus antibiootikumiravi jooksul.

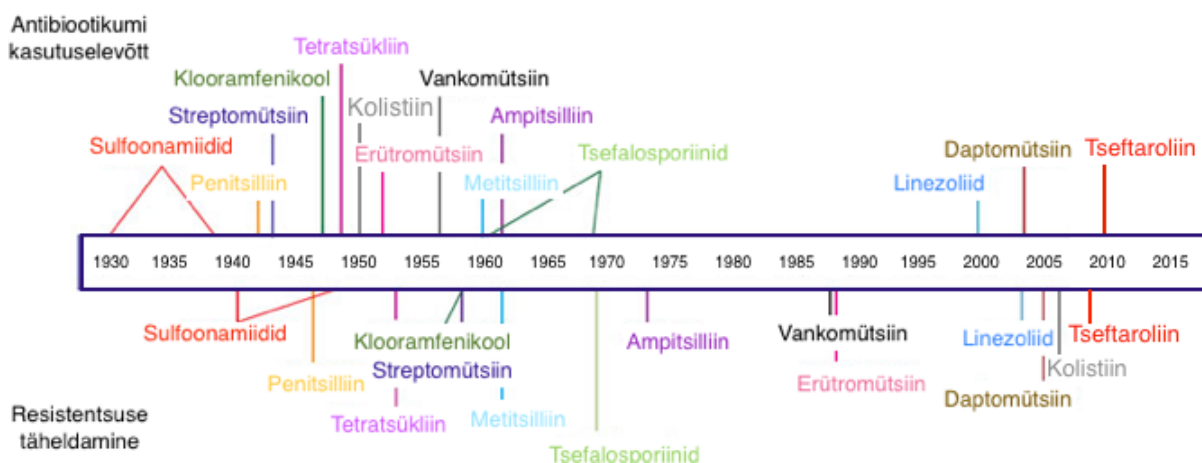
Magistritöö praktilise osa eesmärk oli luua k-meeridel põhinev töövoog, mille abil tuvastada *P. aeruginosa* genoomist nii varem teadaolevaid kui potentsiaalseid uusi resistentsusega seotud markereid, kuid mis oleks rakendatav ka teistele liikidele ning ükskõik milliste mõõdetavate fenotüüpide genoomsete markerite tuvastamiseks.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Antibiootikumiresistentsus, levik ja mehhanismid

1.1.1 Antibiootikumiresistentsuse ülevaade

Antibiootikumiresistentsus on defineeritud, kui bakteritüve võime jääda ellu ning jätkata kasvamist antibiootikumi kontsentratsioonil, mis mõjub enamusele selle liigi tüvedele tapvalt või inhibeerivalt (Russell, 2000). Esimest korda kirjeldati bakterite resistentsust penitsilliini suhtes juba paar aastat enne penitsilliini laialdast kasutuselevõttu (Abraham ja Chain, 1940). Antibiootikumiresistentsuse eest hoiatas ka penitsilliini avastaja Aleksander Fleming oma 1945. aastal peetud Nobel'i kõnes, öeldes, et on kerge muuta baktereid penitsilliinile resistentseks, kui hoida neid kokkupuutes penitsilliini kontsentratsiooniga, millest ei piisa nende tapmiseks (Fleming, 1945). Penitsilliini laialdasest kasutuselevõtmisest ei möödunud kümnet aastatki, kui resistentsus oligi juba muutunud oluliseks kliiniliseks probleemiks. Vastuseks resistentsuse ilmunisele avastati ja võeti kasutusele üha uusi antibiootikume ning edu bakterite vastu võitlemisel püsis. Paraku tekkis resistentsus kiiresti ka kõikide teiste kasutusele võetud antibiootikumide suhtes (joonis 1) ning kuna uute antibiootikumide kasutuselevõtmine lakkas eelmise sajandi lõpus erinevatel majanduslikel ja regulatoorsetel põhjustel, siis on bakterinakkused käesolevaks ajaks muutunud taas inimkonnale ohtlikuks (Ventola, 2015).



Joonis 1. Antibiootikumide kasutuselevõtmise ning antibiootikumiresistentsuste täheldamise ajajoon (Beno *et al.*, 2006; Clatworthy *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Nation ja Li, 2009).

Bakterite antibiootikumiresistentsuse evolutsioneerumine on naturaalne protsess ning antibiootikumid ja resistentsus on eksisteerinud ammu enne antibiootikumide avastamist

inimese poolt (Fair ja Tor, 2014). Viimastel kümnenditel toimunud antibiootikumiresistentsete bakterite arvukuse tõusu taga on aga antibiootikumide liigkasutus, alakasutus ning valestikasutus meditsiinis, põllumajanduses ja muudes valdkondades (Davies ja Davies, 2010). Oletatakse, et antibiootikumiresistentsuse tekkele aitab kaasa ka antiseptikumide ning desinfektantide laialdane kasutus (McDonnell ja Russell, 1999). See on tekitanud bakterites lakkamatu selektsioonilise surve, millele nad vastavad resistentsusgeenide omandamisega kõikvõimalikest allikatest, kasutades selleks oma unikaalset geneetilist omadust - horisontaalset geeniülekanget (HGT). Välja on arenenud mitmeid resistentsusmehhanisme kõikidele praktilisse kasutusse jõudnud antibiootikumidele (Davies ja Davies, 2010). Mitmeid resistentsusmehhanisme võib esineda koos ka ühes bakterirakus, ning kui need pakuvad kaitset erinevate antibiootikumide suhtes, on tegemist multiravimiresistentse (MDR) bakteriga (Rosenblatt-Farrell, 2009). Selliste bakterite vastu võitlemiseks võetakse kasutusele nn "viimase õlekõrre" antibiootikumid, mille mõju tervisele võib olla küsitav, kuid mille suhtes ei ole laialt levinud resistentsust. Üheks selliseks näiteks on kolistiin, mida on viimase 15-20 aasta jooksul kasutatud MDR gram-negatiivsete bakterite nagu näiteks *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ja *Klebsiella pneumoniae* nakkuste puhul (Nation ja Li, 2009). Paraku täheldati 2004-2005 aastal ka kolistiiniresistentsuse tekkimist *P. aeruginosa* kliinilistes isolaatides kromosomaalsete mutatsioonide tagajärjel (Benoit *et al.*, 2006) ning 2015. aasta novembris kirjeldati Hiinas isoleeritud *Escherichia coli* tüvedel esmakordselt ka kolistiiniresistentsust, mis oli põhjustatud plasmiidse *mcr-1* (mobiliseeritud kolistiiniresistentsus 1) geeni olemasolust (Gao *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Sellele järgnes kolistiiniresistentsust põhjustava plasmidi tuvastamine maailma eri paikades, sealhulgas Eestis (Brauer *et al.*, 2016). Kolistiiniresistentsuse levik kuulutab ette tõeliselt pan-resistentsete ehk kõikide antimikroobsete ühendite suhtes resistentsete bakteritüvede ilmumist (Gill *et al.*, 2016; McGann *et al.*, 2016). Üks selline kõigi nakkuste raviks kasutada olnud antibiootikumide suhtes resistentne *K. pneumoniae* tüvi isoleeriti USA-s Nevadas 19. augustil 2016 (Chen *et al.*, 2016).

Käesoleval ajal hinnatakse, et antibiootikumiresistentsed bakterid põhjustavad igal aastal ülemaailmselt 700 000 surmajuhtumit ning sealhulgas nii USA-s kui ka Euroopa Liidus üle 20 000 surmajuhtumi. Sellega seonduvaid kulutusi hinnatakse miljarditesse eurodesse igal aastal. Prognoositakse, et aastaks 2050 on ülemaailmne surmajuhtude arv tõusnud 10 miljonini aastas ning summeeritud kulu maailma SKP-le tõusnud 100 triljoni USD-ni (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health, and Human

Services, 2013; ECDC/EMA Joint Working Group, 2009; O'Neill, 2014). Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) peab antibiootikumiresistentsust üheks suuremaks ohuks inimkonna tervisele (World Health Organisation, 2016) ning hoiatab, et antibiootikumiresistentsuse leviku tõttu võime 21. sajandil jõuda post-antibiootilisse ajajärku (World Health Organisation, 2014). Kõige suuremaks ohuks inimeste tervisele peab WHO resistentsuse levikut selliste bakterite seas nagu nt. *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ja *Campylobacter* spp. (World Health Organisation, 2017).

1.1.2 Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid

Bakterite antibiootikumiresistentsust saab jagada loomulikuks resistentsuseks ja omandatud resistentsuseks (Blair *et al.*, 2015).

Loomuliku resistentsuse all mõeldakse bakterile omastest struktuursetest ja funktsionaalsetest omadustest tulenevat võimet vastu seista mingite antibiootikumide toimele. Lihtsaim näide loomulikust resistentsusest mingi antibiootikumi suhtes on olukord, kus bakteris puudub antibiootikumi sihtmärkmolekul. Näiteks biotsiid triklosaan on efektiivne suure hulga gram-positiivsete ja gram-negatiivsete bakterite vastu, kuid tal puudub mõju gram-negatiivsetele bakteritele perekonnast *Pseudomonas*. Alguses arvati, et see tuleneb aktiivsest biotsiidi väljapumpamisest, kuid hiljem selgitati välja, et *Pseudomonas* perekonna bakterid omavad triklosaani sihtmärgiks oleva ensüümi enoüül-ACP (enoüül-atsüülkandja valgu) reduktaasi mitte-sensitiivset varianti. Teiseks loomuliku resistentsuse näiteks on lipopeptiid daptomüsiin (DAP), mis tuli kliinilisse kasutusse 2003. aastal ja mis on efektiivne vaid gram-positiivsete bakterite suhtes. Gram-negatiivsetel bakteritel on tsütoplasma membraanis vähem anioonseid fosfolipiide ja see vähendab antibakteriaalseks toimeks vajalikku Ca^{2+} -vahendatud DAP-i insertiooni tsütoplasma membraani. Gram-negatiivsed bakterid omavad ka välismembraani, millest mitmed antibiootikumid ei suuda läbi tungida. See annab gram-negatiivsetele bakteritele resistentsuse mitmete ühendite vastu. Üheks selliseks ühendiks on glükopeptiid vankomüsiin (Blair *et al.*, 2015).

Lisaks loomulikule resistentsusele võivad algselt mingile antibiootikumile tundlikud bakterid omandada resistentsuse vastava antibiootikumi suhtes. Omandatud resistentsus võib tuleneda

kromosomaalsetes geenides toimunud mutatsioonidest või resistentsust pakkuva välise geneetilise materjali omandamisest (Shaikh *et al.*, 2015).

Mutatsioonilise resistentsuse korral tekib osades tundlike bakterite populatsioonist pärit bakterites mutatsioon antibiootikumitundlikkust määravas geenis. Selle tulemusel säilib nende bakterite ellujäämus antibiootikumi olemasolul. Antibiootikum eemaldab tundlikke baktereid ning mutatsiooniga bakterid saavutavad ülekaalu. Mutatsiooniline resistentsus on sageli kulukas bakteri homöostaasile ja seda säilitatakse tihti vaid antibiootikumi olemasolul keskkonnas (Munita ja Arias, 2016).

Sagedaseks antibiootikumi resistentsuse tekke põhjuseks on ka resistentsust pakkuva välise geneetilise materjali omandamine, mis toimub bakterites HGT vahendusel. HGT jaguneb transformatsiooniks, transduktsiooniks ja konjugatsiooniks (Shaikh *et al.*, 2015). Transformatsioon on HGT lihtsaim vorm, kus keskkonnas asuv DNA järjestus võetakse bakterirakku ning sisestatakse genoomi, kuid ainult vähesed kliiniliselt olulised bakterid suudavad sel viisil resistentsust omandada. Resistentsuse teke haiglates toimub sageli läbi konjugatsiooni, mis nõuab rakk-rakk kontakti ja on väga efektiivne geeniülekanne meetod (Munita ja Arias, 2016). Konjugatsioon toimub sageli läbi mobiilsete geneetiliste elementide (MGE), kuigi on kirjeldatud ka otsest kromosoomist kromosoomi ülekannet (Manson *et al.*, 2010). Antibiootikumiresistentsuses tähtsat rolli omavad MGE-d on plasmiidid ja transposoonid. Üks efektiivsemaid antibiootikumiresistentsusgeenide omandamise mehhanisme toimub läbi integronide (Munita ja Arias, 2016). Integronid on geneetilised elemendid, mis on võimelised omandama ja ümberkorraldama mobiilse geenikassetti vormis olevaid avatud lugemisraame ning muutma neid funktsionaalseteks geenideks (Cambray *et al.*, 2010).

Antibiootikumiresistentsuse mehhanisme kategoriseeritakse vastavalt biokeemilistele radadele:

- 1) mehhanismid, mis vähendavad antibiootikumi rakusisest kontsentratsiooni, kas takistades antibiootikumi rakku sisenemist või pumbates antibiootikumi efektiivselt rakust välja;
- 2) mehhanismid, mis modifitseerivad antibiootikumi sihtmärki või vähendavad antibiootikumi toimimist sihtmärgile;
- 3) mehhanismid, mis inaktiveerivad antibiootikumi läbi hüdrolüüsi või modifitseerimise;
- 4) mehhanismid, mis tekitavad resistentsust läbi bakteri üldise kohanemisprotsessi (Munita ja Arias, 2016).

1.1.2.1 Antibiootikumi rakusisese kontsentratsiooni vähendamine

Paljud kliinilises praktikas kasutatavad antibiootikumid omavad rakusiseseid sihtmärke. Gram-negatiivsete bakterite puhul asuvad antibiootikumide sihtmärgid sageli ka sisemembraanis. Seega selleks, et antimikroobne ühend saaks jõuda oma sihtmärgini, peab ta läbima bakteri välismembraani ning sageli ka sisemembraani. Bakteritel on antimikroobse ühendi sihtmärgini jõudmise takistamiseks välja arenenud antimikroobse ühendi sisenemist takistavad mehhanismid (Munita ja Arias, 2016).

Sellised mehhanismid on eriti olulised gram-negatiivsetel bakterites, kelle välismembraan toimib läbilaskvusbarjäärina ja kes on antibiootikumidele seetõttu vähem vastuvõtlikumad. Hüdrofiilsed antibiootikumid nagu näiteks β -laktaamid, tetratsükliinid, klooramfenikoolid ja fluorokinoloonid difundeeruvad bakterisse läbi välismembraanis leiduvate poriin valkude (Delcour, 2009). Enterobakterite peamisi poriine, nagu näiteks *E. coli* OmpF ja OmpC (välismembraani valgud F ja C; ingl. k. *outer membrane proteins F and C*), peetakse mittespetsiifilisteks kanaliteks (Kojima ja Nikaido, 2013). Seega välismembraani läbilaskvust ja antibiootikumide sisenemist rakku saab piirata poriinide allareguleerimisega ning nende asendamisega selektiivsemate kanalitega. Uuringud näitavad, et poriinide allareguleerimine või modifitseerimine resistentsuse saavutamiseks toimub *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ja *Acinetobacter* spp. bakterites kokkupuutel uute antibiootikumidega (nt uute karbapeneemidega) isegi juhul, kui nende pikemalt kasutuses olnud lähedaste ühendite suhtes on resistentsus saavutatud ensümaatilise lagundamise teel (Blair *et al.*, 2015). Poriinide allareguleerimise või asendamisega saavutatakse sageli vaid madalal tasemel resistentsus ning seda mehhanismi seostatakse sageli teiste resistentsusmehhanismidega nagu näiteks kasvanud väljavoolu pumpade ekspressiooni tase (Munita ja Arias, 2016).

Väljavoolu pumpasid leidub mitmeid klasse nii gram-negatiivsetes kui gram-positiivsetes bakterites (Piddock, 2006). Need pumbad võivad olla substraadispetsiifilised (nt tetratsükliini resistentsuspumbad *tet* geenidelt ja makroliidi resistentsuspumbad *mef* geenidelt), aga võivad transportida rakust välja ka paljusid erisuguseid ühendeid (Munita ja Arias, 2016). Neid viimaseid tuntakse ka MDR väljavoolu pumpade nime all (Blair *et al.*, 2015). Üleekspresseerituna võivad väljavoolu pumbad anda bakteritele kõrgel tasemel resistentsuse mitmete varem efektiivselt toiminud antibiootikumide (nt fluorokinoloonid, β -laktaamid, karbapeneemid ja polümüksiinid) suhtes (Munita ja Arias, 2016). Viis suuremat väljavoolu pumpade perekonda on: peamine abistaja superperekond (MFS), väike multiravimiresistentsuse perekond (SMR), resistentsus-nodulatsioon-rakujagunemise

perekond (RND), ATP-siduv kassett perekond (ABC) ja multiravimi ja toksiliste ühendite väljavoolu perekond (MATE) (Piddock, 2006). Väljavoolu pumpade geenid võivad paikneda nii MGE-des kui ka kromosoomides ning nende transkriptsioon on nii lokaalsete kui globaalsete regulaatorite kontrolli all. Mutatsioonid intergeensetes saitides, lokaalsetes repressorites ja globaalsetes transkriptsioonifaktorites on väljavoolu pumpade kõrge ekspressioonitaseme sagedasteks põhjustajateks (Blair *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Antibiootikumi sihtmärgi modifitseerimine ja selle kaitsmine antibiootikumide toime eest

Sage viis resistentsuse saavutamiseks on antibiootikumi ja tema sihtmärgi vahelise interaktsiooni takistamine. Seda saavutatakse nii sihtmärgi kaitsmise kui sihtmärgi modifitseerimise läbi (Munita ja Arias, 2016).

Antibiootikumi sihtmärki kaitsvaid valke kodeeritakse enamasti MGE-delt, kuid on leitud ka vastavaid valke kodeerivaid kromosomaalseid gene. Sellise mehhanismi läbi on bakterid resistentsuse saavutanud näiteks tetratsükliini, fluorokinoloonide ja fusidiinhappe suhtes (Munita ja Arias, 2016). Näiteks kinolooni resistentsusvalk Qnr seondub kinolooni sihtmärgiks oleva güraasiga, vähendades güraasi DNA-ga seondumise võimet. Güraas-DNA kompleks on aga vajalik kinoloonide antibiootiliselt toimeks (Tran *et al.*, 2005).

Kuna antibiootikumi ja sihtmärgi vahel toimub väga spetsiifiline interaktsioon, siis juba väikesed muutused sihtmärgi struktuuris võivad mõjutada antibiootikumi seondumist (Giedraitiene *et al.*, 2011). Sellised resistentsusmehhanismid leiduvad peaaegu kõikide antibiootikumide suhtes. Sihtmärgi modifikatsioonide alla kuuluvad: punktmuutatsioonid sihtmärki kodeerivates geenides, seondumissaidi ensümaatilised muutused (nt metüülgrupi lisamine), originaalsihtmärgi väljavahetamine (Munita ja Arias, 2016).

Näiteks on kirjeldatud aminohappelisi muutuseid põhjustavaid punktmuutatsioone rifamütsiini sihtmärgiks oleva RNA polümeraasi β subühikut kodeerivas geenis *rpoB*, mis tekitavad kõrgetasemelist resistentsust rifamütsiini suhtes (Taniguchi *et al.*, 1996). Muutused penitsilliini siduvas valgus (PBP) toovad kaasa nende vähenenud afiinsuse β -laktaamide suhtes. Sellise mehhanismi läbi on saavutanud näiteks *E. faecium* resistentsuse ampitsilliini suhtes ning *S. pneumoniae* resistentsuse penitsilliini suhtes (Giedraitiene *et al.*, 2011).

Ensümaatilise modifitseerimise heaks näiteks on MLS antibiootikumidide (makroliidid, linkosamiidid ja streptogramiinid) sihtmärgiks oleva 50S ribosomaalse subühiku 23S rRNA metüleerimine *erm* (erütromütsiini ribosomaalne metülatsioon) geenilt sünteesitava ensüümi poolt. MLS antibiootikumide seundumissaidid 23S rRNA-l on ülekattuvad ning seetõttu võib selline metüleerimine tuua kaasa resistentsuse kõigi nende antibiootikumide suhtes (Weisblum, 1995).

Lisaks kirjeldatud mehhanismidele võivad bakterid omandada täiesti uusi sihtmärkide alternatiive, mis omavad sama funktsionaalsust originaalsihtmärgiga, kuid ei ole inhibeeritavad antibiootikumi poolt (Munita ja Arias, 2016). Sellise mehhanismi läbi on tekkinud näiteks metitsilliiniresistentsed *S. aureus*-ed, kes on oma originaal PBP valgu välja vahetanud penitsilliinide suhtes madala afiinsusega PBP2a vastu, mida kodeeritakse mobiilsete geneetiliste elementide "stafülokoki kassett kromosoom *mec*" (SCC*mec*) koosseisus levivatelt *mecA* (metitsilliiniresistentsus A) geenidelt (Malachova ja DeLeo, 2010).

Antibiootikumide sihtmärkide ekspressiooni suurendamine on samuti üks bakterites esinev viis antibiootikumide toimele vastu seismiseks. Sellise mehhanismi näiteks on bakterite resistentsus trimetoprim-sulfametoksasoolile. Need antibiootikumid inhibeerivad folaadi sünteesis olulisi ensüüme nagu dihidropteroaadi süntaas (DHPS) ja dihidrofolaaadi reduktaas (DHFR). Teatud mutatsioonid nende ensüümide promootorregioonides aga tõstavad vastavate ensüümide tootmist bakteris ning alandavad antibiootikumide folaadi sünteesi inhibeerivat toimet, võimaldades bakteritel ellu jääda (Munita ja Arias, 2016).

1.1.2.3 Antibiootikumi modifitseerimine ja hüdrolüüsimine

Üks efektiivsemaid bakterite antibiootikumiresistentsuse mehhanisme on antibiootikumide ensümaatiline modifitseerimine või lagundamine. Selliste mehhanismide läbi saavutatakse olukord, kus antibiootikum ei ole enam võimeline sihtmärgiga interakteeruma (Munita ja Arias, 2016). Antibiootikume modifitseerivad ensüümid viivad läbi antibiootikumide (aminoglükosiidid, klooramfenikool, streptogramiin, makroliidid või rifampitsiin) atsetüleerimist, adenüleerimist või fosforüleerimist (Shaiko *et al.*, 2015).

Ensümaatiline modifitseerimine on kõige laiemalt levinud aminoglükosiidide vastase resistentsuse põhjustaja. Aminoglükosiidid on ühendid, mis omavad aminotsülitool tuuma (streptamiin, 2-deoksüstrepatriin või streptidiin), mis enamasti on läbi glükosiidsete sidemete

seotud aminosuhkrutega (Ramirez ja Tolmasky, 2010). Nende toime seisneb peamiselt bakteri valgusünteesi takistamises läbi seondumise prokarüootse ribosoomiga (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Aminoglükosiide modifitseerivad ensüümid katalüüsivad deoksüstrepamiin tuuma või sellega seotud aminosuhkrute -OH või -NH₂ rühmade modifitseerimist. Neid klassifitseeritakse vastavalt katalüüsitava reaktsioonitüübile aminoglükosiid atsetüültransferaasideks (AAC), aminoglükosiid nukleotidüültransferaasideks (ANT) ja aminoglükosiid fosfotransferaasideks (APH) ning samuti klassifitseeritakse neid vastavalt positsioonile, kus nad modifitseerimist läbi viivad. Tänapäevaks on avastatud hulgaliselt erinevaid aminoglükosiide modifitseerivaid ensüüme ning peaaegu puuduvad bakterid, kes ei oleks võimelised sellist mehhanismi omandama (Ramirez ja Tolmasky, 2010).

Antibiootikume hüdrolüüsivatest ensüümidest on tuntuimad β -laktamaasid, mis avastati *E. coli*-st juba enne kui esimene β -laktaam antibiootikum penitsilliin jõudis kliinilisse praktikasse (Bradford, 2001). β -laktamaasid inaktiveerivad antibiootikume hüdrolüüsides nende β -laktaam ringide amiidsidemeid. β -laktamaasid põhjustavad β -laktaam resistentsust mitmetes gram-negatiivsetes bakteriliikides ning ka mõningates gram-positiivsetes bakteriliikides ning neid klassifitseeritakse järjestuse homoloogia põhjal nelja erinevasse gruppi A, B, C, D (Matagne *et al.*, 1998). Tänapäevaks on kirjeldatud üle tuhande erineva β -laktamaasi (Munita ja Arias, 2016). β -laktamaasid omavad aminohappelist sarnasust β -laktaamide sihtmärkensüümide PBP-dega ning oletatakse, et need ensüümid on evolutsiooniliselt seotud (Samraoui *et al.*, 1986).

1.1.2.4 Bakteri kohanemine antibiootikumi olemasoluga

Selleks, et saada hakkama erinevates ebasõbralikes keskkondades nagu näiteks inimkeha, on bakteriaalsetel patogeenidel olemas erinevaid komplekseid reguleerivaid mehhanisme, mille abil nad väldivad oluliste rakuliste protsesside nagu näiteks rakuseinasüntees ja membraani homöostaasi kahjustumist. On leitud, et muutused sellistes üldist raku kohanemist mõjutavates reguleerivates mehhanismides põhjustavad resistentsust daptomütsiinile (DAP) ja vankomütsiinile (Munita ja Arias, 2016).

DAP on lipopeptiidne antibiootikum, mille bakteriotsiidne efekt tuleneb rakuümbrise homöostaasi muutmisest (Pogliano *et al.*, 2012). DAP-i sarnaseid ühendeid toodab ka imetajate immuunsüsteem ning nende toimele vastu seismiseks on bakteritel välja kujunenud ürgsed kaitsemehhanismid (Tran *et al.*, 2015). Uuringud on näidanud, et DAP resistentsete

gram-positiivsete tüvede kujunemisel on olulised mutatsioonid bakterite rakuümbrise stressivastust kujundavas kolmekomponendilises regulaatorsüsteemis LiaFSR (Lia - lipiid II tsükkel-interfereeruv antibiootikumide valk) (Arias *et al.*, 2011). On tõendeid, et sellesse regulaatorsüsteemi kuuluv LiaR mõjutab anioonsete fosfolipiidide nagu näiteks kardiolipiini reorganiseerumist. DAP resistentsuse põhjusena nähakse LiaR mutatsioonidest tulenevat kardiolipiini mikroklastrite ümberjagamist DAP sihtmärgiks olevast septumist teistesse plasmamembraani osadesse (Tran *et al.*, 2013).

Sarnastes raku ümbrise homöostaasi kontrollivates geenides aset leidnud mutatsioone seostatakse ka vankomütsiinile keskmiselt resistentsete *S. aureus* (VISA) tüvede tekkega (Gardete ja Tomasz, 2014). On leitud, et VISA tüved seovad vankomütsiini aktiivsemaltki, kui mitte-VISA tüved, kuid takistatud on antibiootikumi difusioon rakuseina sisemistesse osadesse, kus paiknevad sihtmärgid (Munita ja Arias, 2016).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

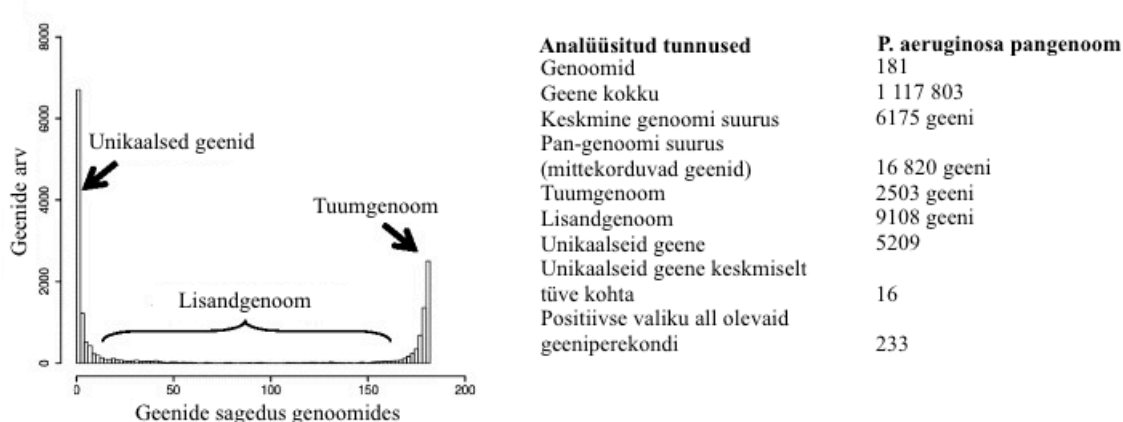
1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ülevaade

Pseudomonas aeruginosa on gram-negatiivne bakter, mis oportunistliku patogeena põhjustab tõsiseid akuutseid ja kroonilisi infektsioone (Dean *et al.*, 2003). Seda bakterit iseloomustab tolerantsus erinevatele füüsikalistele tingimustele ning võime jääda ellu keskkondades, kus toitaineid on väga vähe. Need omadused on võimaldanud tema levimist paljudesse erinevatesse keskkondadesse, sealhulgas haiglatesse (Lister *et al.*, 2009). Ta on ligikaudu 10% nosokomialsete infektsioonide põhjustaja (Verchere *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* puhul on kõige suuremaks probleemiks tema võime omandada resistentsus antibiootikumiravi käigus (Lister *et al.*, 2009). Antibiootikumide difusiooni läbi *P. aeruginosa* välismembraani on hinnatud 100 kuni 200 korda madalamaks, kui läbi *E. coli* välismembraani (Yoneyama ja Nakae, 1993).

P. aeruginosa referentstüve PAO1 genoom koosneb 6,3 miljonist aluspaarist (Stover *et al.*, 2000) ja on seega üks suuremaid prokarüootseid genoome (LaBaer *et al.*, 2004). Omades ~5570 avatud lugemisraami (ORF), sarnaneb see bakteritüvi geneetilise kompleksuse poolest pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae*-ga, kelle genoom kodeerib 6200 ORF-i. Kokkusobivalt *P. aeruginosa* suurepärase kohanemisvõimega, sisaldab ta genoom suures proportsioonis regulatoorseid geene ning nelja potentsiaalset kemotaksise süsteemi. Lisaks

omab bakter hulgaliselt katabolismi, transpordi ja orgaaniliste ühendite väljavooluga seotud geene (Stover *et al.*, 2000).

P. aeruginosa pangenoomi ehk liigi tervikliku geenikomplekti suuruseks on ühe uuringu põhjal hinnatud >16 000 geeni (vt joonis 2). Pangenoomist vaid ~15% moodustab tuumgenoom ehk vaid ~15% geenidest on olemas igas bakteris ja ~31% pangenoomi geenidest esinesid vaid ühes tüves. Ligikaudu vaid 40% selle liigi genoomist on konstantne ehk ühe konkreetse bakteri genoomist moodustab tuumgenoom ~40% (Mosquera-Rendón, J., et al., 2016).



Joonis 2. *Pseudomonas aeruginosa* pangenoomis leiduvate geenide esinemissageduse histogramm ja pangenoomi iseloomustavad tunnused (Mosquera-Rendón, J., et al., 2016).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* infektsioonide raviks kasutatavad antibiootikumid

Tulenevalt *P. aeruginosa* välismembraani väikesest läbilaskvusest on selle bakteri nakkuste vastu võitlemisel efektiivsed vähesed antibiootikumiklassid (Li *et al.*, 2012). Sellised antibiootikumid on näiteks aminoglükosiidid, mida on kasutatud pikka aega ning kasutatakse tänapäevalgi, kuid mille suhtes on välja kujunenud laialt levinud resistentsus (Poole, 2005). Tõuseb ka *P. aeruginosa* resistentsus tema vastu kasutatavate β -laktaamide ja kinoloonide suhtes (Gunderson *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* infektsioonide ravimisel on tänapäeval väga tähtsal kohal β -laktaamide hulka kuuluvad karbapeneemid, kuid ka resistentsus nende antibiootikumide vastu on üha sagedasem (Li *et al.*, 2012). MDR *P. aeruginosa* tüvede vastu kasutatakse "viimase õlekõrre" antibiootikumina kolistiini, mis on eelmise sajandi keskpaigas välja töötatud, kuid alles käesoleval sajandil suuremates mahtudes kasutusele võetud antibiootikum (Nation ja Li, 2009). Kolistiiniresistentsus tekib *P. aeruginosa*-s hõlpsasti laborikatsetuste käigus, kuid haigla tingimustes on kolistiiniresistentsuse tekkimine harv

nähtus ka kolistiini aktiivsel manustamisel *P. aeruginosa* nakkusega patsientidele (Jansen *et al.*, 2016).

Tabel 1. Valik antibiootikumidest, mida kasutatakse *P. aeruginosa* infektsioonide ravimiseks. Info ühendite anti-pseudomonaalse toime, klassi ja toimemehhanismi kohta pärineb NCBI PubChem andmebaasist (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017). Info ühendite minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni e MIC murdepunktide kohta pärineb Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Euroopa Komitee (EUCAST) vastavasisulisest dokumendist (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017).

Antibiootikum	Klass	Toimemehhanism	MIC murdepunktid (mg/L)	
			Tundlikkus <=	Resistentsus >
Kolistiin	Polümüksiinid (polüpeptiid antibiootikumid)	Välismembraani struktuuri rikkumine	2	2
Tsefepiim	tsefalosporiinid (β-laktaam antibiootikumid)	Rakuseina sünteesi inhibeerimine	8	8
Tseftasidiim	tsefalosporiinid (β-laktaam antibiootikumid)	Rakuseina sünteesi inhibeerimine	8	8
Piperatsilliin	penitsilliinid (β-laktaam antibiootikumid)	Rakuseina sünteesi inhibeerimine	16	16
Imipeneem	karbapeneemid (β-laktaam antibiootikumid)	Rakuseina sünteesi inhibeerimine	4	8
Meropeneem	karbapeneemid (β-laktaam antibiootikumid)	Rakuseina sünteesi inhibeerimine	2	8
Tsiprofloksatsiin	kinoloonid	DNA replikatsiooni inhibeerimine	0,5	0,5
Amikatsiin	aminoglükosiidid	valgusünteesi inhibitsioon	8	16
Tobramütsiin	aminoglükosiidid	valgusünteesi inhibitsioon	4	4
Gentamitsiin	aminoglükosiidid	valgusünteesi inhibitsioon	4	4

1.2.3 Resistentsus *Pseudomonas aeruginosa*-s

P. aeruginosa antibiootikumiresistentsus võib tuleneda nii MGE-de (nt plasmiidide) koosseisus omandatud resistentsusgeenidest kui ka kromosomaalsetest mutatsioonidest. Suurimaks ohuks on *P. aeruginosa* MDR (kolmele või enamale antibiootikumile

resistentsete) tüvede sagenemine. MDR tüved võivad tekkida mitmete omandatud resistentsusgeenide tulemusel, omandatud ja kromosomaalselt kodeeritud resistentsusmehhanismide kombinatsioonina, mitmete kromosomaalsete mutatsioonide akumulierumisel või ka üksikutest mutatsioonidest nt väljavoolu pumpa kodeerivas geenis (Lister *et al.*, 2009).

Tabel 2. RND väljavoolupumpade regulaatorid

Regulaator	Funktsioon	Viide
MexR, NalC	<i>mexAB-oprM</i> operoni negatiivsed regulaatorid	Cao <i>et al.</i> , 2004; Evans <i>et al.</i> , 2001
MexL	<i>mexJK</i> operoni negatiivne regulaator	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2005
MexZ	<i>mexXY</i> operoni negatiivne regulaator	Jahandideh, 2013
NfxB	<i>mexCD-oprJ</i> operoni negatiivne regulaator	Poole <i>et al.</i> , 1996
MexS	<i>mexEF-oprN</i> operoni negatiivne regulaator	Sobel <i>et al.</i> , 2005
MexT	<i>mexEF-oprN</i> operoni positiivne regulaator	Köhler <i>et al.</i> , 1999

MDR *P. aeruginosa* tüvede tekkel omavad peamist rolli väljavoolu pumbad. Nende bakterite genoomist on identifitseeritud väljavoolu pumpasid kõikidest suurematest väljavoolu pumpade perekondadest (SMR, ABC, MATE, MFS, RND). Kõik *P. aeruginosa*-st tuvastatud multiravimi väljavoolu pumbad kuuluvad RND perekonda. Sealjuures on RND süsteeme *P. aeruginosa*-st leitud tunduvalt rohkem (vähemalt 10), kui teistest tuntud patogeenidest (Stover *et al.*, 2000). RND perekonda kuuluv ja konstitutiivselt ekspresseeritud MexAB-OprM on üks peamine loomulikk ja omandatud resistentsust vahendav multiravimi eksporter (Sennhauser *et al.*, 2009). MexAB-OprM süsteemi inaktiveerimine põhjustab *P. aeruginosa* hüpersensitiivsust erinevate antibiootikumide suhtes (Masuda *et al.*, 1999). Ülejäänud *P. aeruginosa*-s leiduvad RND väljavoolu pumbad kannavad nimesid: MexCD-OprJ, MexEF-OprN ja MexXY-OprM, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OpmE, MexMN ja TriABC. Mex tähistab sõnapaari "mitmene väljavool", Tri sõnapaari "triklosaani väljavool" ja Opr sõnapaari "välismembraani poriin". Need väljavoolu pumbad on võimelised rakust välja pumpama ühendeid klassidest nagu fluorokinoloonid, tetratsükliinid, klooramfenikoolid, β -laktaamid, β -laktamaasi inhibiitorid, makroliidid, novobiotsiinid, trimethoprimid ja sulfoonamiidid (Lister *et al.*, 2009). RND väljavoolu pumpade operonide transkriptsiooni kontrollivad negatiivsed regulaatorid nagu näiteks mexR, mexL, mexZ, nfxB, mexS ja nalC (vt. Tabel 2). Seega mutatsioonid, mis rikuvad nende negatiivsete regulaatorite funktsiooni, põhjustavad väljavoolupumpade üleekspressiooni ning MDR fenotüübi teket (Cao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2015). MexEF-OprN väljavoolupump vajab ainsana RND pumpadest ka funktsionaalse positiivse regulaatorgeeni *mexT* olemasolu ning *mexS* mutatsioonidega kaasneb ka OprD poriini alaekspressioon (Sobel *et al.*, 2005).

P. aeruginosa resistentsust fluorokinoloonide suhtes on seostatud mutatsioonidega fluorokinoloonide sihtmärkmolekulide DNA güraasi subühikute *gyrA* ja *gyrB* ning topoisomeraas IV subühikute *parC* ja *parE* (par - jagunemisvalk) kromosomaalsetes geenides. *GyrA* ja *parC* geenides paiknevad mutatsioonid on seotud kõrge fluorokinolooniresistentsuse tekkega, kuid *gyrB* ja *parE* geenides paiknevad mutatsioonid on madala sagedusega ning omavad komplementaarset rolli (Nouri *et al.*, 2016). Fluorokinolooniresistentsuses omab rolli ka RND väljavoolupumpade üleekspressioon (Lister *et al.*, 2009).

P. aeruginosa resistentsus β -laktaamidele (va karbapeneemid) võib tuleneda kromosomaalselt kodeeritud β -laktamaasi (täpsemalt tsefalosporinaasi) AmpC ekspressioonitaseme märkimisväärselt tõusust (Juan *et al.*, 2006). AmpC valku kodeeriva geeni *ampC* ekspressiooni regulatsiooniga on seotud *dacB* (D-alanüül-D-alaniin karboksüpeptidaas B) geenilt kodeeritav PBP4 (Moya *et al.*, 2009) ja LysR perekonda kuuluvad valgud: sisemembraani permeaas AmpG, tsütosoolsed peptiidoglükaani retsükleerivad amidaasid AmpD1, AmpDh2, AmpDh3 (mõju AmpC ekspressioonile AmpD1>AmpDh3>AmpDh2) ja transkriptsioonifaktor AmpR (Schmidtke ja Hanson, 2008). PBP4 reguleerib lisaks *ampC* geenile veel kahekomponendilise regulaatorsüsteemi CreBC (Cre - süsinikuallika tundlik) ja selle poolt reguleeritava membraanivalgu CreD ekspressiooni, mis on samuti seotud β -laktaamiresistentsusega (Moya *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* β -laktaamiresistentsus võib tuleneda ka β -laktamaasi geenide omandamisest MGE-de koosseisus. *P. aeruginosa* puhul ei ole selline nähtus siiski nii levinud kui näiteks *Enterobacteriaceae* perekonnast pärit bakterite puhul. Enamik *P. aeruginosa*-st leitud omandatud β -laktamaase on penitsillinaasid, millel puudub efekt oksüimino-tsefalosporiinide ja karbapeneemide suhtes. Ka plasmiidset edasi kanduvad laienenud spektriga β -laktamaasid on *P. aeruginosa* tüvedes üha sagedasemad (Chen *et al.*, 2015), kuid ainult nendest ei piisa karbapeneemiresistentsuse põhjustamiseks (Lister *et al.*, 2009).

P. aeruginosa väikese läbilaskvusega välismembraanis leidub poriid kolmest suurest perekonnast: OprD substraadispetiifiliste poriidide perekond, OprM väljavooluporiinide perekond ja TonB-interakteeruvate ligand-reguleeritud poriidide perekond (vastavalt 19, 18 ja 35 erinevat poriid) (Hancock ja Brinkman, 2002). OprM on seotud mitmete antibiootikumide (nt. fluorokinoloonid, tetratsükliin, erütromütsiin, tsefepiim) väljavooluga ja suurendab *P. aeruginosa* resistentsust nende antibiootikumide suhtes nii MexAB-OprM väljavoolupumba koosseisus olles kui eraldiseisvalt (Zhao *et al.*, 1998). OprD vähenenud ekspressioon või selle

funktsionaalsete variantide asendumine mitte-funktsionaalsetega põhjustab resistentsust karbapeneemide suhtes (Lister *et al.*, 2009).

OprD on substraatspetsiifiline poriin, mida mööda liiguvad bakterirakku aminohapped, peptiidid aga ka karbapeneemide klassi kuuluvad antibiootikumid (Trias ja Nikaido, 1990). Seega põhjustab vähenenud OprD ekspressioon või selle funktsionaalsete variantide asendumine mitte-funktsionaalsetega resistentsust karbapeneemide suhtes (Lister *et al.*, 2009). OprD teises ja kolmandas lingus asuvad imipeneemi sidumis ja/või sisenemissaidid ning seega võivad kõik nendes lingudes toimunud mutatsioonid viia imipeneemi resistentsuse tekkeni (Li *et al.*, 2012). On näidatud, et selliseid mutatsioone tekib bakteri kliiniliste isolaatide OprD geenidesse ka antibiootikumiravi jooksul (Quinn *et al.*, 1986). Oma hüpermuteeruvuse ja kõrge reguleerituse tõttu peetakse OprD-ga seonduvaid mehhanisme kõige levinumaks *P. aeruginosa* karbapeneemiresistentsuse põhjustajaks (Li *et al.*, 2012). Ainult OprD defitsiitsusest siiski alati ei piisa, et bakteritüve MIC erinevate karbapeneemide suhtes tõuseks üle vastuvõtlik/resistentne murdepunkti. Karbapeneemi resistentsuses omavad rolli ka RND väljavoolu pumpade üleekspressioon (Lister *et al.*, 2009) ja plasmiidsetelt geenidelt, nagu näiteks *bla_{IMP-18}* (imipenemaas metallo- β -laktamaas 18), kodeeritavad metallo- β -laktamaasid (Wolter *et al.*, 2009).

Resistentsus aminoglükosiidide suhtes tuleneb *P. aeruginosa*-s kõige sagedamini neid antibiootikume inaktiveerivate ensüümide (AAC-d, APH-d ja ANT-d) geenide omandamisest (Poole, 2005). Kuigi selliste ensüümide toimespektrid varieeruvad, võib *P. aeruginosa* omandada mitmeid selliseid ensüüme ning potentsiaalselt saavutada resistentsuse kõikide aminoglükosiidide suhtes (Lister *et al.*, 2009). Lisaks võib *P. aeruginosa* aminoglükosiidiresistentsus tuleneda ka 16S rRNA-d metüleerivatest metüültransferaasidest nagu näiteks RmtA ja RmtD (Doi *et al.*, 2007), mida seostatakse samuti MGE-dega (Yamane *et al.*, 2004).

Tabel 3. Geenid, mille olemasolu või milles esinevate mutatsioonide olemasolu on seostatud resistentsuse tekkega *P. aeruginosa*-s. Näited resistentsuse tekkega seotud mutatsioonidest nendes geenides. Protsessid, milles antud geenide produktid osalevad ning antibiootikumid, mille resistentsusega antud geene või geenides leiduvaid mutatsioone seostatakse.

Geen	Mutatsioon(id)	Protsess, milles geeniprodukt osaleb	Resistentsus antibiootikumidele	Viited
<i>mexR</i>	c.73C>T (nonsenssmutatsioon), Gln49Pro, Arg70Gln, Arg83His, Tyr130Pro	väljavoolupumba <i>MexAB-OprM</i> operoni negatiivne regulatsioon	β -laktaamid, tetratsükliin, erütromütsiin, klooramfenikool, fluorokinoloonid	Saito <i>et al.</i> , 1999; Zhao <i>et al.</i> , 1998
<i>nfxB</i>	His87Arg, Arg21His, Ala30Thr, Arg42Gly, Arg42His, Arg42Cys, Asp56Gly, Leu62Val, Arg82Leu, His87Arg	väljavoolupumba <i>MexCD-OprJ</i> operoni negatiivne regulatsioon	fluorokinoloonid, β -laktaamid, makroliidid, tetratsükliin, klooramfenikool, tigetsükliin	Poole <i>et al.</i> , 1996; Purssell ja Poole, 2013; Monti <i>et al.</i> , 2015
<i>mexZ</i>	Ile16Thr, Thr32Asn, Ala38Val, Gly46Ser, Val48Ala, Gly50Asp, Gly195Glu, Ser198Ile	väljavoolupumba <i>MexXY</i> operoni negatiivne regulatsioon	aminoglükosiidid, fluorokinoloonid, tsvitterioonsed tsefalosporiinid, erütromütsiin,	Guénard <i>et al.</i> , 2014; Masuda <i>et al.</i> , 2000
<i>mexS</i>	Tyr127Stop, Val333Gly, Ser124Arg, 91 bp deletsioon T402-st kuni G492-ni	väljavoolupumba <i>MexEF-OprN</i> operoni negatiivne regulatsioon ja <i>OprD</i> poriini positiivne regulatsioon	fluorokinoloonid, klooramfenikool, trimetoprim, karbapeneemid	Sobel <i>et al.</i> , 2005
<i>mexL</i>	A47D	väljavoolupumba <i>MexJK</i> operoni negatiivne regulatsioon	erütromütsiin, tetratsükliin	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2002; 2005
<i>gyrA</i>	Thr83Ile	DNA replikatsioon	fluorokinoloonid	Nouri <i>et al.</i> , 2016
<i>gyrB</i>	Ser467Phe, Glu468Asp	DNA replikatsioon	fluorokinoloonid	Yang <i>et al.</i> , 2015, Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>parC</i>	Ser87Leu, Ala88Pro	DNA replikatsioon	fluorokinoloonid	Nouri <i>et al.</i> , 2016
<i>parE</i>	Asp419Asn, Glu459Asp	DNA replikatsioon	fluorokinoloonid	Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>ampR</i>	Asp135Asn	β -laktamaasi <i>ampC</i> regulatsioon	β -laktaamid (va peneemid)	Schmidtke ja Hanson, 2008
<i>ampD1</i>	Gly148Ala, Asp183Tyr	β -laktamaasi <i>ampC</i> negatiivne regulatsioon	β -laktaamid (va peneemid)	Schmidtke ja Hanson, 2008
<i>ampDh3</i>	Asp137Gly, Ala219Thr	β -laktamaasi <i>ampC</i> negatiivne regulatsioon	β -laktaamid (va peneemid)	Schmidtke ja Hanson, 2008
<i>dacB</i>	Thr428Pro, Gln322Arg	<i>ampC</i> ja CreBCD süsteemi regulatsioon	β -laktaamid	Moya <i>et al.</i> , 2009
<i>oprD</i>	c.1018C>T, c.511G>T (nonsenssmutatsioonid)	karbapeneemide rakku sisenemine	karbapeneemid	Pirnay <i>et al.</i> , 2002
<i>bla_{IMP-18}</i>	-	β -laktaamide (karbapeneemide) hüdrolüüsimine	karbapeneemid	Wolter <i>et al.</i> , 2009
<i>aac</i> , <i>aph</i> , <i>aad</i>	-	aminoglükosiidide atsetüleerimine	aminoglükosiidid	Teixeira <i>et al.</i> , 2016
<i>rmtA</i> , <i>rmtD</i>	-	16S rRNA metüleerimine	aminoglükosiidid	Doi <i>et al.</i> , 2007

1.3 Antibiootikumiresistentsuse hindamine

Antimikroobse tundlikkuse hindamine (AST) on oluline, kui antibiootikumi plaanitakse rakendada bakteril, mille liigikaaslaste hulgas leidub antud antibiootikumi suhtes resistentseid tüvesid. Sellise bakteri liigilisest kuuluvusest ei saa usaldusväärselt järeldada tema tundlikkust rakendatavale antibiootikumile. AST-i kasutatakse ka uute väljatöötatud antimikroobsete ühendite võimekuse hindamiseks ning resistentsete patogeenide epidemioloogia uurimiseks (Jenkins ja Schuetz, 2012).

Bakteri antibiootikumiresistentsuse mõõtmiseks on mõõtühikuna kasutusel minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon e MIC. See tähistab madalaimat antibiootikumi kontsentratsiooni, mis inhibeerib bakteri kasvu. MIC murdepunktide alusel jagatakse baktereid antibiootikumile tundlikeks, keskmiselt resistentseteks ja resistentseteks. Antibiootikumiresistentsuse mõõtmise meetoditena on kasutusel näiteks disk-difusioon meetod, vedelsöötme lahjendusmeetod, tardsöötme lahjendusmeetod ja gradient difusioon meetod (Smaill, 2000).

Disk-difusioon meetodi puhul asetatakse bakteritega eelnevalt inokuleeritud tardsöötmele antibiootikumiga kindla kontsentratsioonini läbi immutatud paberkettad. Paberketastest difundeerub antibiootikum söötmesse ning ketta ümber moodustub antibiootikumi kontsentratsioonigradient - kettast eemaldudes kahaneb antibiootikumi kontsentratsioon logaritmiliselt. Bakterid jäetakse kasvama ning selle käigus moodustub ketta ümber ringikujuline inhibitsioonitsoon, kus bakterid ei suuda antibiootikumi kõrge kontsentratsiooni tõttu kasvada. MIC on pöördvõrdelises seoses inhibitsioonitsooni suurusega. Disk-difusioon ei võimalda määrata kvalitatiivset MIC väärtust (Jenkins ja Schuetz, 2012), vaid võimaldab määrata bakterit resistentseks või tundlikuks vastavalt inhibitsioonitsooni ulatusele (Smaill, 2000).

Vedel- ja tardsöötme lahjendusmeetodid ning gradient difusioonmeetod võimaldavad määrata MIC väärtusi kvantitatiivselt ja kujutavad endast antibiootikumi kontsentratsiooni kahekordsete lahjenduste seeriaid vastavalt vedelsöötme tuubides, tardsöötme plaatidel või kommertsiaalsel testribal (Smaill, 2000). Tard - ja vedelsöötme lahjendusmeetodi korral külvatakse baktereid erineva kontsentratsiooniga söötmetesse ning tuvastatakse minimaalne bakteri kasvu inhibeeriv antibiootikumi kontsentratsioon (Wiegand *et al.*, 2008). Gradient difusioontestide (nt Etest) puhul asetatakse bakteritega eelnevalt inokuleeritud tardsöötmele

kommertsiaalsed plastikribad, mille ühele küljele on loodud antibiootikumi kontsentratsioonigradient ning teisele küljele on prinditud vastavat kontsentratsioonigradienti tähistav skaala. Testribast difundeerub antibiootikum söötmesse ning moodustub ellipsoidne inhibitsioonitsoon, mille testribaga lõikumise kohalt loetakse (skaalalt) testitava bakteri MIC antud antibiootikumi suhtes (Jenkins ja Schuetz, 2012).

Kirjeldatud fenotüübipõhised AST meetodid on pika ajalooga (näiteks disk difusioon meetodit kirjeldati esmakordselt juba 1966. aastal) (Bauer *et al.*, 1966) ning neil põhinevad endiselt ka tänapäeva kliinilise mikrobioloogia laboratooriumites teostatavad AST-d. Nad on väga usaldusväärsed, kuid samas aeganõudvad, kuna vajavad suurt arvu baktereid ja tulemused saabuvad seega sageli liiga hilja. AST-de puhul on aga kõige olulisem saada kiiresti usaldusväärsed ennustused antibiootikumiravi tulemuse kohta (Van Belkum ja Dunne, 2013), et neist lähtuvalt teha valik õige antibiootikumi kasuks. Fenotüübipõhise AST testimise tulemused võivad saabuda 24 kuni 96 tundi pärast patogeeni puhaskultuuri eraldamist. Seega on lühikesele antibiootikumikuurile alluvate infektsioonide korral fenotüübipõhised testid peaaegu kasutud. Üldiselt tulemused, mis saabuvad pärast 48 h on väikese kliinilise väärtusega ning on vähetõenäoline, et neid tulemusi saab rakendada õige antibiootikumi valimisel (Ledeboer ja Hodinka, 2011).

Alternatiivne lahendus fenotüübipõhisele AST testimisele on nukleiinhappepõhine AST testimine (Fluit *et al.*, 2001), millel on potentsiaal olla kõige kiirem ning tundlik AST testimise viis (Ledeboer ja Hodinka, 2011). Nukleiinhappepõhised AST testid põhinevad näiteks PCR-l, mikrokiip tehnoloogiatel või kogugenoomi sekveneerimisel (WGS) (Köser *et al.*, 2014).

PCR testide abil võib tulemused saada juba 45 min kuni 2h jooksul (Ledeboer ja Hodinka, 2011). PCR põhised metitsilliini resistentse *S. aureuse* e. MRSA tuvastamise testid on kasutuses juba üle kümne aasta (Salisbury *et al.*, 1997) ning lisandunud on *Enterococcus* spp. vankomütsiini resistentsuse testid (Stamper *et al.*, 2007) ning *M. tuberculosis*-e rifampitsiini resistentsuse tuvastamise testid (Boehme *et al.*, 2010). PCR põhiste AST testide kliinilist olulisust näitab uuring, kus rPCR põhise MRSA tuvastamise testi rakendamisega *S. aureus* nakkusega patsiendil vähendati patsiendi intensiivravis viibitud aega keskmiselt 6,2 päeva võrra ning ühe nakkusepisoodi kohta hoiti keskmiselt kokku 21 000 USD (Bauer *et al.*, 2010). PCR-l põhinevate testide puuduseks on asjaolu, et nad suudavad samaaegselt tuvastada vaid väheseid sihtmärke (Card *et al.*, 2013). Mõningate liikide ja antibiootikumide puhul on

efektiivseks resistentsuse testimiseks vaja aga korraga tuvastada sadu resistentsusmarkereid (Ledeboer ja Hodinka, 2011).

Kui on vaja korraga tuvastada palju resistentsusmarkereid, võivad kõige efektiivsemateks PCR põhiste testide alternatiivideks osutuda mikrokiipidel põhinevad testid, mis suudavad kiirelt ja täpselt tuvastada paljusid resistentsusega seotud sihtmärke. Bakteri kasvatamist vajavate mikrokiipidel põhinevate testidega võib tulemused saada ~24 h varem kui fenotüübipõhiste testidega (Card *et al.*, 2013). Otse kliinilistele proovidele rakendatavad mikrokiip testid omavad potentsiaali tuvastada bakterite resistentsust juba ~2,5 h jooksul (Ledeboer ja Hodinka, 2011).

Antibiootikumiresistentsuse ennustamisel WGS andmetest on saadud häid tulemusi (Gordon *et al.*, 2014; Köser *et al.*, 2013) ning WGS annaks resistentsuse tuvastamisel ka ajalise võidu kui seda rakendada otse kliinilistele proovidele. Paraku jääb otse kliinilistele proovidele rakendatava WGS-i hind hetkel liiga kalliks ning tundlikkus liiga madalaks, et seda saaks eelistada PCR-le või fenotüübipõhiste tundlikkustestidele. Puhaskultuuride korral on aga kiirem ja (taaskord) odavam rakendada fenotüübipõhiseid teste. Antimikroobse tundlikkuse hindamine WGS andmetest on raha ja aega säästev juhul, kui bakteri WGS andmed produtseeritakse nagunii, näiteks epidemioloogiliste uuringute tarbeks (Köser *et al.*, 2014). Arengud seoses WGS-i otse kliinilistele proovidele rakendatavusega ja kiirete Nanopore sekveneerijatega võivad kaasa aidata WGS-i kasutusele võtmisel antimikroobse tundlikkuse hindamiseks (Lee ja Behr, 2016).

Nukleiinhappepõhised AST testid on praktilised vaid siis kui suudetakse tuvastada kõik tavalisemad resistentsuse mehhanismid ning seega on selliste testide välja arendamiseks vajalik leida bakteritest võimalikult palju resistentsetele fenotüüpidele vastavaid nukleiinhappepõhiseid markereid (Ledeboer ja Hodinka, 2011).

1.4 Antibiootikumiresistentsusmarkerite tuvastamine

Uute resistentsust põhjustavate geenide ja mutatsioonide identifitseerimine aitab paremini mõista bakteri resistentsusmehhanisme, avastada sihtmärke uutele ravimitele, kontrollida efektiivsemalt infektsioonide levikut, disainida uusi DNA põhiseid teste resistentsete fenotüüpide tuvastamiseks ja optimeerida antibiootikumikuure (Bakour *et al.*, 2016).

Bakteris leiduvate uute ning teadaolevate resistentsusmarkerite tuvastamiseks saab rakendada WGS andmeid (Fournier *et al.*, 2014). Teadaolevate resistentsusmarkerite tuvastamiseks saab kogugenoomi järjestusest otsida homolooge resistentsusmarkerite andmebaaside vastu. Resistentsete ja tundlike tüvede WGS andmete võrdluse põhjal (juht-kontrolluuring) saab tuvastada ka uusi resistentsusmarkereid (Bakour *et al.*, 2016). Uute resistentsusmarkerite tuvastamiseks on vajalik omandada arusaam tüvedes eksisteerivate mutatsioonide mõjudest tüvede fenotüüpidele (Davis *et al.*, 2016). Kuna bakterid on klonalsed organismid, siis suur osa nende genoomist on aheldatuse tasakaalutuses ükskõik millise tunnuse suhtes. Selleks, et tuvastada mingi tunnusega (nt. antibiootikumiresistentsusega) põhjuslikult seotud markereid, on vajalik, et vaatluse all olev tunnus ei esineks unikaalselt vaid ühel klonalsel liinil (Lees *et al.*, 2016).

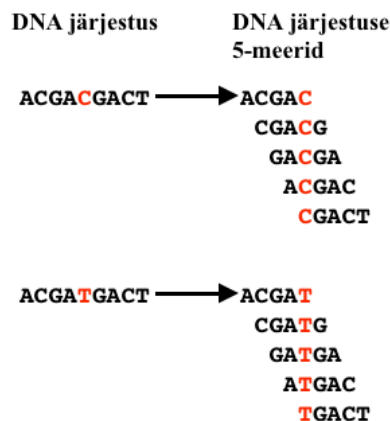
Üks võimalus uute resistentsusmarkerite tuvastamiseks on läbi viia üle-genoomne assotsiatsiooniuuring (GWAS), kus märkimisväärsete mutatsioonide tuvastamiseks joondatakse paljude lähedalt seotud tüvede lugemeid referentstüve genoomijärjestuse vastu (Davis *et al.*, 2016). GWAS-i on küll edukalt rakendatud tuumgenoomi mutatsioonide leidmiseks, kuid võttes arvesse tänaseks päevaks teada olevate bakterite genoomide plastilisust, võib arvata, et sellised lähenemised suudavad tuvastada vaid osa olemasolevatest resistentsusmarkeritest (Lees *et al.*, 2016). Näiteks moodustab tuumgenoom *P. aeruginosa* pangenuomist vaid ~15% ning lisandgenoom ~85% (vt joonis 2). Et tuvastada selliste varieeruvate genoomidega liikide puhul ka lisandgenoomis leiduvaid resistentsusmarkereid on näidatud, et tuleks kasutada referentsgenoomi põhiste analüüside asemel pangenuomi põhiseid analüüse (Tettelin *et al.*, 2005). Ilmselt tulenevalt *P. aeruginosa* genoomi suurest varieeruvusest, pole teada ka GWAS analüüsil põhinevaid uusi *P. aeruginosa* resistentsusmarkereid tutvustavaid töid.

Alternatiivsed lahendused GWAS-le on erinevad masinõppealgoritmid, mis leiavad kompleksest andmekogumist (nt. bakterite pangenuom) asjakohaseid tunnuseid, mille põhjal saab teha tugeva paikapidavusega ennustusi. Mitmed sellised masinõppealgoritmid otsivad antibiootikumiresistentsusega seotud oligonukleotiidseid k-meere, mida saaks rakendada mitte-teadaolevate fenotüüpidega bakterite genoomidel fenotüübi klassifitseerimiseks (Davis *et al.*, 2016).

1.5 K-meerid ja neil põhinevad resistentsusmarkerite tuvastamise tarkvarad

1.5.1 K-meerid

K-meerid on mingi spetsiifilise tähestiku põhjal koostatud k pikkusega sõned (Compeau *et al.*, 2011). Keskendudes DNA järjestustele võib k -meere vaadelda k pikkusega oligomeeridena, mis on koostatud nukleotiidide sisaldava tähestiku $\Sigma = \{A, C, G, T\}$ põhjal. DNA järjestuses pikkusega L esineb kokku $(L - k + 1)$ k -meeri (Sonnenburg *et al.*, 2008) (vt joonis 3). Erinevaid võimalikke k -meere on 4^k (Compeau *et al.*, 2011). k -meeride kasutamisel geneetilistes testides pakuvad pikemad k -meerid kõrgemat spetsiifilisust, kuid madalamat sensitiivsust kui lühikesed k -meerid (Lees *et al.*, 2016).



Joonis 3. Näide ühe nukleotiidi variatsiooniga 9 nukleotiidi pikkustest DNA järjestustest ning nendes järjestustes sisalduvatest 5-meeridest.

k -meere on kasutatud bakterigenoomide assambleerimisel, SNP-de ja indelide leidmisel ning evolutsiooniliste kauguste hindamisel (Lees *et al.*, 2016). Mitmed k -meeri põhised analüüsid võrdlevad erinevaid järjestusi, et leida k -meere, mis oleks unikaalsed mingile spetsiifilisele järjestusele või ühised mingile järjestuste grupile. k -meeri põhiste genoomianalüüsimeetodite eelised seisnevad selles, et nad ei vaja genoomi assambleerimist ja analüüse saab teostada otse toorlugemitel (Kaplinski *et al.*, 2015), samuti ei vaja nad referentsgenoomi olemasolu (Dubinkina *et al.*, 2016) ja on töökindlad ka genoomsete ümberkorralduste olemasolul (Drouin *et al.*, 2016).

1.5.2 SEER

SEER (*sequence element enrichment analysis*) on Inglise, Soome, Austraalia ja Norra teadlaste koostöös valminud ning 2016. aastal publitseeritud tasuta tarkvara, mis võimaldab tuvastada bakteritest järjestuse elemente (k-meere), mis on märkimisväärselt rikastunud huvipakkuvates fenotüüpides (Lees *et al.*, 2016).

SEER-i puhul on tegu eraldiseisva töövooga, mis kasutab sisendandmetena kas *de novo* assambleeritud genoomijärjestusi või toorlugemeid. Kasutades kõikvõimalike informatiivsete (üle 9 nukleotiidi pikkuste) k-meeride skaneerimisel *distributed string mining* algoritmi, on SEER rakendatav korraga kümnetele tuhandetele bakterigenoomidele. SEER-i kümnetele tuhandetele genoomidele või toorlugemitele rakendamiseks on siiski vajalik kasutada suure võimekusega serverit. Leitud k-meeridel viiakse läbi kiire assotsiatsioonitest ning referentsivaba klonaalse populatsioonistruktuuri korrigeerimine. Statistilise olulisuse piiri ületanud k-meerid filtreeritakse välja ning annoteeritakse. SEER tuvastab antibiootikumiresistentsust määravaid geene, SNP-sid ja ka muid mutatsioone (nt indelid) (Lees *et al.*, 2016).

Autorid rakendasid SEER-i suurel hulgal *S. pneumoniae* ja *Streptococcus pyogenes* genoomidel ja tuvastasid mitmeid varem kirjeldatud ja potentsiaalseid uusi resistentsuse markereid (Lees *et al.*, 2016). Pole teada, et SEER-iga oleks saadud tulemusi väga suure ja keeruka resistoomi poolest tuntud *P. aeruginosa* (Breidenstein *et al.*, 2011) resistentsusmehhanismide väljaselgitamisel.

1.5.3 Kover

Kover on Kanada teadlaste poolt 2016. aastal publitseeritud tasuta tarkvara, mis põhineb k-meeridel ja masinõppe algoritmil, tuvastab esmalt referentsivaba genoomide võrdlusega asjakohaseid genoomseid biomarkereid (nt antibiootikumiresistentsusmarkereid) ning sellele järgnevalt loob nendel markeritel põhinevaid fenotüüpi (nt antibiootikumiresistentsust) ennustavaid mudeleid (Drouin *et al.*, 2016).

Kover on arvutuslikult skaleeritav ning kohandatud WGS andmete analüüsimiseks. Sisendandmetena saab kasutada nii assambleeritud kui ka toorlugemeid ning korraga saab analüüsida tuhandeid genoome. Kover on kasutatav erinevatel organismidel ning erinevaid fenotüüpe ennustavate mudelite loomiseks. Loodud mudelid põhinevad võimalikult väikesel

arvul fenotüüpi ennustavatel k-meeridel, mis tulenevad genoomsetest biomarkeritest nagu nt SNP-dest, indelitest või suurematest genoomsetest ümberkorraldustest. Genoomsete biomarkerite valimine mudelisse põhineb *Set Covering Machine* algoritmil, mis valib mudelisse markereid lähtuvalt nende võimekusest üheskoos täpset fenotüüpi ennustada (Drouin *et al.*, 2016).

Autorid rakendasid Kover-it nelja bakteriliigi (*C. difficile*, *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* ja *S. pneumoniae*) resistentsust ennustavate mudelite loomiseks (vastavalt 5, 5, 4, 3 antibiootikumi suhtes). Paljude andmehulkade puhul jäid veamäärad tunduvalt alla 10%-i, kuid *P. aeruginosa* puhul ei suutnud programm genotüübi põhjal täpselt ennustada enamike testitud antibiootikumide resistentsust (Drouin *et al.*, 2016).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli:

- luua k-meeridel põhinev töövoog, mille abil saaks tuvastada bakterites leiduvaid genoomseid antibiootikumiresistentsuse markereid;
- rakendada antud töövoogu bakteriliigil *P. aeruginosa*.

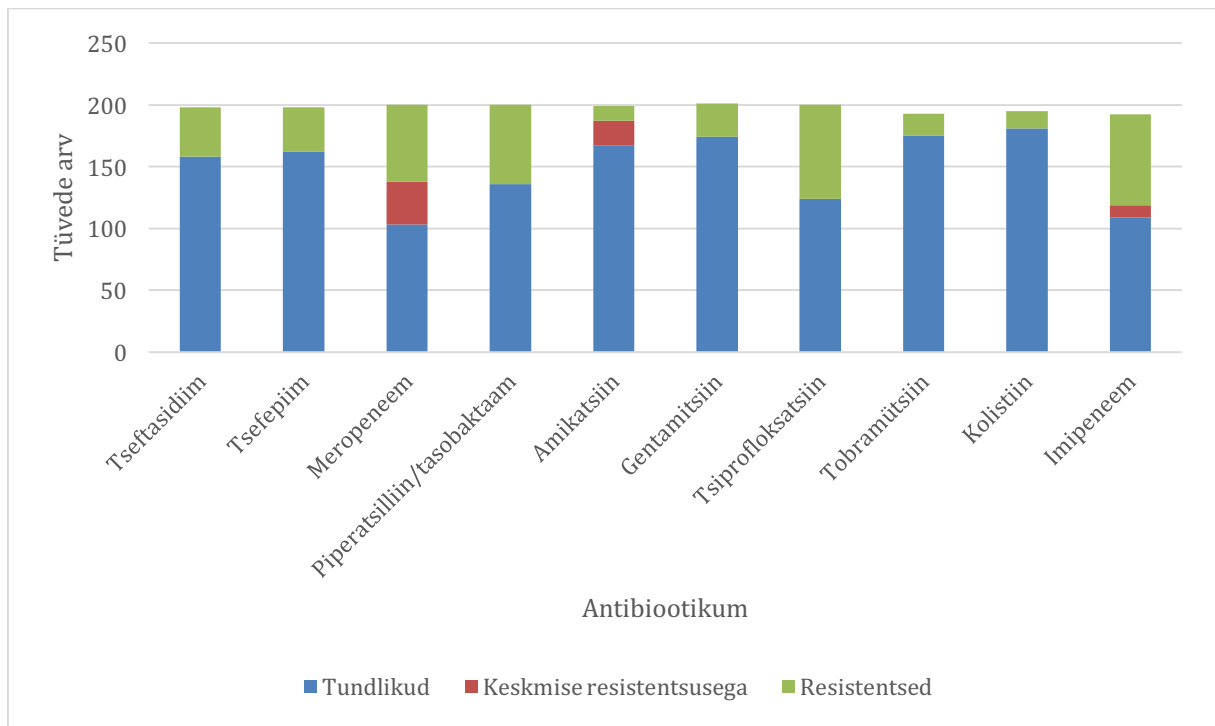
2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Lähteandmed

Antud magistritöö lähteandmeteks olid 204 *Pseudomonas aeruginosa* tüve, mis olid isoleeritud tervishoiuteaduste võimekuse edendamise programmi (TerVE) raames läbi viidud projekti "Antibiootikumiresistentsuse levikuteed (ABRESIST)" käigus.

Isoleeritud tüved pärinesid meditsiinisüsteemist patsientidelt ja kandjatelt, seafarmidest, farmitööstuselt, koertelt ja nende omanikelt ning keskkonnast (põllud ja pinnavesi). Tüvedele olid olemas programmiga SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) assambleeritud genoomid ning neile olid mõõdetud E-testiga MIC-d kuni kümne antibiootikumi (tseftasidiim, tsefepiim, meropeneem, piperatsilliin/tasobaktaam, amikatsiin, gentamitsiin, tsiprofloksatsiin, tobramütsiin, kolistiin ja imipeneem) suhtes. Resistentsete, keskmiselt resistentsete ja tundlike tüvede osakaal käesolevas andmestikus on näidatud joonisel 4 (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

Olemasolevatest andmetest moodustus 10 andmekogumit, mis koosnesid 192-201 paarist (x, y), kus x tähistab mingi *P. aeruginosa* isolaadi assambleeritud genoome ($x \in \{A, C, G, T\}^*$) ning y selle isolaadi MIC väärtust vastavale andmekogumile spetsiifilise antibiootikumi suhtes ($y \in \{0.008, \dots, 1024\}$). Sellistest paaridest koosnevatel andmekogumitel põhines antud töös läbiviidud genoomsete resistentsusmarkeritega seotud k-meeride otsimine.

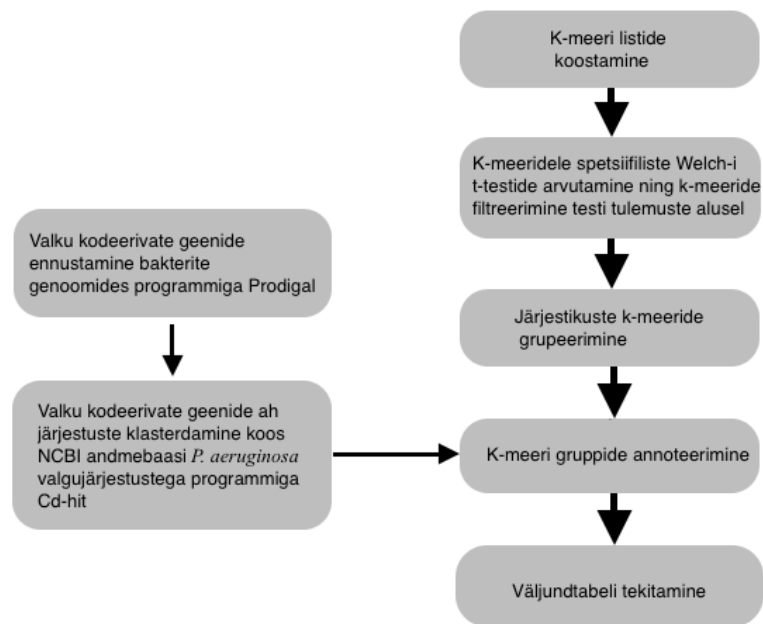


Joonis 4. Resistentsete, keskmiselt resistentsete ja tundlike tüvede osakaalud iga antibiootikumi suhtes (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

2.2.2 Töövoog antibiootikumiresistentsuse markerite leidmiseks bakterite genoomidest

Antibiootikumiresistentsuse markerite leidmiseks koostati töövoog (joonis 5), mis algab töös kasutatud bakteritüvedele k-meeri listide loomisega. Seejärel arvutatakse igale k-meerile spetsiifiline Welch'i t-testi tulemus, mille põhjal valitakse edasiseks analüüsiks välja statistiliselt olulised k-meerid. Välja valitud k-meerid, mis paiknevad genoomis järjestikku, grupeeritakse ning saadud grupid annoteeritakse läheduses paikneva geenijärjestusega. Lõpuks tekitatakse töövoogi väljundtabel, kuhu kogutakse antibiootikumiresistentsusmarkerite tuvastamiseks oluline info.

Järgnevates alapeatükkides on antud täpsem ülevaade kõikide etappide läbiviimisest ja nendes etappides valitud parameetritest.



Joonis 5. Antibiootikumiresistentsuse markerite otsimise töövoos skeem.

2.2.2.1 K-meeri listide koostamine

K-meeri listide loomiseks kasutati GenomeTester4 programmpaketi programmi *glistmaker*, mis võimaldab k-meeri listide loomiseks kasutada nii bakterite sekveneerimise toorlugemeid kui assambleeritud kontiige ning k-meeri pikkuseks saab valida 1-32 nukleotiidi (Kaplinski *et al.*, 2015).

Loodud töövoos saab k-meeride arvu piirata k-meeride sageduste või suhteliste sageduste alusel resistentsusmarkerite otsimiseks kasutatavates genoomides. Näiteks saab välja valida k-meerid, mis esinevad >5 ja <95 genoomis või >5% ja <95% genoomides. T-testi arvutamiseks sobilikena filtreeritakse vaikselt välja k-meerid, mis esinevad 2-s kuni (n-1)-s genoomis.

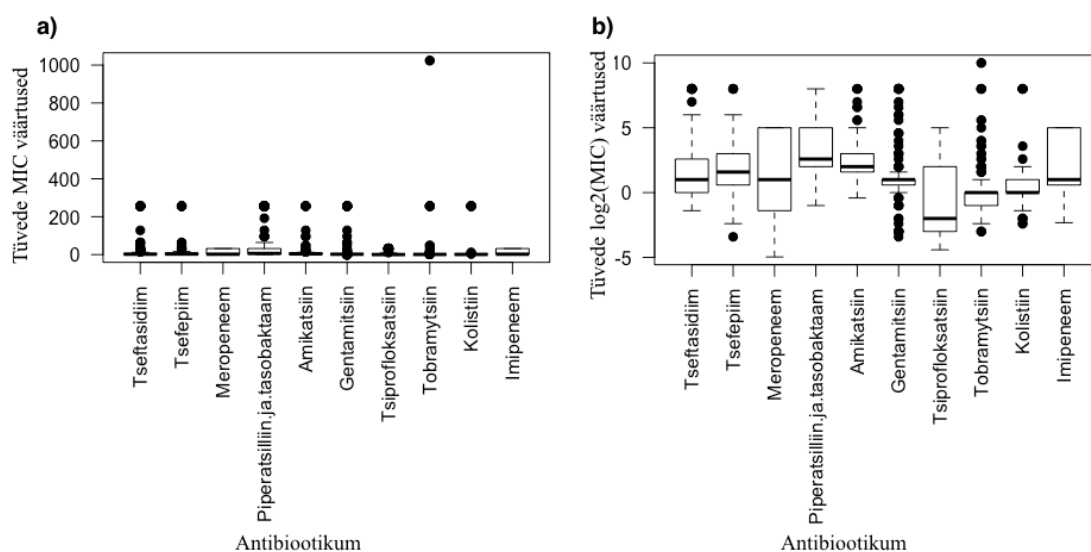
Käesolevas magistritöös loodi resistentsusmarkerite otsimiseks kasutatud *P. aeruginosa* tüvedele 16-meeride listid, kasutades selleks bakterite assambleeritud genoome (prooviti ka 25-meere, mis olid mutatsioonide tuvastamisel vähem tundlikud).

2.2.2.2 K-meeridele spetsiifiliste Welch-i t-testide arvutamine ning k-meeride filtreerimine testi tulemuste alusel

Järgnevalt selgitati k-meeride hulgast välja need, mis leiduvad tüvedes, mille logaritmitud MIC väärtuste keskmine (mingi testitava antibiootikumi suhtes) on statistiliselt oluliselt

kõrgem k-meere mitte omavate tüvede logaritmitud MIC väärtuste keskmisest. Selleks arvutati iga antibiootikumi puhul kõikidele 2-s kuni (n-1)-s selle antibiootikumi resistentsusmarkerite otsimiseks kasutatud genoomis leidunud k-meeridele Welch-i t-testi tulemused.

Welch-i t-testide arvutamisel kasutati MIC väärtuste logaritme, et vähendada väga suurte ja väikeste MIC väärtuste mõju MIC väärtuste keskmisele. MIC väärtuste ja MIC väärtuste logaritmide jaotus on näidatud joonisel 6.



Joonis 6. Karpdiagrammid, mis kirjeldavad bakteritüvede a) MIC ja b) MIC väärtuste logaritmide jaotust erinevate antibiootikumide suhtes.

Welch-i t-test-i valimiteks olid seega mingit k-meeri X k-meeride listis sisaldavate ja mittesisaldavate tüvede logaritmitud MIC väärtused (testitava antibiootikumi suhtes). Welch-i t-testi kasutati kuna valimites ei eeldatud võrdse dispersiooni olemasolu. Testi nullhüpoteesiks (H₀) oli: kmeeri X sisaldavate tüvede keskmine log(MIC) ei erine kmeeri X mitte-sisaldavate tüvede keskmisest log(MIC)-st. Testi alternatiivseks hüpoteesiks (H₁) oli: kmeeri X sisaldavate tüvede keskmine log(MIC) erineb kmeeri X mittesisaldavate tüvede keskmisest log(MIC)-st. Nullhüpoteesi ümberlukkamisel kasutati olulisuse nivood $\alpha=0.05$ ning rakendati Bonferroni (mitmese testimise) korrigeerimist. Seega valiti edasiseks analüüsiks välja k-meerid, mille puhul õnnestus tõestada H₁ ehk t-statistiku p-väärtus oli väiksem kui (0,05/testitud k-meeride arv).

Informatsioon k-meeride (vt. Tabel 5) olemasolu või puudumise kohta erinevates tüvedes koguti Shelli skripti ning GenomeTester4 programmide abil ning t-testide arvutamiseks kasutati programmeerimiskeele Python SciPy moodulit.

2.2.2.3 Järjestikuste k-meeride grupeerimine

T-statistiku alusel välja sorteeritud ja genoomis järjestikku paiknevad ning ühte või mitut lähestikku asuvat resistentsetele bakteritele spetsiifilist mutatsiooni katvad k-meerid grupeeriti, et kiirendada k-meeride annoteerimisprotsessi ning hõlbustada hilisemat mutatsioonide tuvastamist.

Järjestikku paiknevate k-meeride tuvastamiseks kasutati k-meeride genoomse positsiooni infot, mis saadi k-meeride BLAST (Altschul *et al.*, 1990) joondamisel bakterite assambleeritud genoomide vastu ning programmeerimiskeeltes Shell, Python ja Perl kirjutatud skripte.

2.2.2.4 K-meeride annoteerimine

Järjestikustest k-meeridest koosnevate gruppide annoteerimiseks ennustati programmiga Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) kõikide uuritud bakterite genoomides valku kodeerivad geenid ning nende geenide aminohappelised (ah) järjestused klasterdati koos NCBI andmebaasis olevate annoteeritud *P. aeruginosa* tüvede valkude ah järjestustega, kasutades programmi Cd-hit (Fu *et al.*, 2012) ning parameetreid -c (identsusprotsendi lävend) 0.6 -l (kõrvale jäetavate järjestuste pikkus) 50 ja -s (järjestuste erinevuse lävend) 0.8. Annoteerimisel kasutati kõikide NCBI andmebaasis leiduvate *P. aeruginosa* tüvede valgujärjestusi, et katta võimalikult suur osa *P. aeruginosa* pangenoomist - üksikus *P. aeruginosa* referentstüves leidub vaid ~37% pangenoomis leiduvatest valku kodeerivatest järjestustest (vt joonis 2).

K-meeride positsioonid genoomides tuvastati BLAST (Altschul *et al.*, 1990) joondamise abil. K-meeride positsioone võrreldi ennustatud valku kodeerivate geenide positsioonidega ning annoteerimiseks valiti geenid, mille (eelistuse järjekorras) sees, ees või järel k-meerid paiknesid. Annotatsioon saadi annoteerimiseks valitud geeni ah järjestusega ühte klastrisse klasterdunud NCBI andmebaasi annoteeritud ah järjestustelt.

K-meeride annoteerimiseks kasutati programmeerimiskeeles Python kirjutatud skripte.

2.2.2.5 Väljundtabeli tekitamine

Väljundtabelisse koguti järgnev info:

- grupi moodustavate järjestikuste k-meeride arv;
- gruppi sisaldavate bakteritüvede nimed;
- gruppide annotatsioon erinevates tüvedes;
- järjestikuste k-meeride paiknemine annoteerimiseks kasutatud geeni suhtes;
- järjestikuste k-meeride gruppe sisaldavate ja mitte-sisaldavate tüvede keskmised ja maksimaalsed MIC-d.

Väljundtabeli tekitamiseks kasutati programmeerimis keeles Python kirjutatud skripte.

2.2.2.6 Tulemuste sorteerimine ja kirjeldamine

Väljundtabelis olevaid tulemusi sorteeriti k-meeri gruppe sisaldavate tüvede arvu alusel ning k-meeri gruppe sisaldavate tüvede keskmiste MIC-de järgi. Põhjalikumalt uuriti genoomseid piirkondi, mis olid seotud k-meeridega mille keskmine MIC oli märkimisväärselt kõrgem või madalam tüvedest, kus neid k-meere ei esinenud. Kirjeldati mutatsioone, mis asusid geeni reguleerivas või kodeerivas alas ning põhjustasid aminohappelisi muutuseid, raaminihkeid või mis olid seotud tervete geenide lisandumisega genoomi.

2.2.3 Fülogeneetilise puu loomine

Antud töö lähteandmeteks olnud 204-le *P. aeruginosa* tüvele koostati nende tuumgenoomide põhjal fülogeneetiline puu (vt Lisa 1). Fülogeneetilise puu loomisse kaasati lisaks 31 tüve, millele olid olemas assambleeritud genoomid, kuid puudusid antibiootikumide suhtes mõõdetud MIC väärtused ning referentstüvi PAO1 (PA4_C4).

Bakterite tuumgenoomide joondamiseks kasutati programmi Parsnp (Treangen *et al.*, 2014) parameetritega `-r !` (valib juhusliku genoomi referentsiks) ja `-c` (võtab kõik genoomid kataloogist). Parsnp väljundiks olev XMFA formaadis joondusfail konverteeriti programmi HarvestTools (Treangen *et al.*, 2014) abil multifasta joondusfailiks. Rekombinantsete segmentide leidmiseks kasutati bratNextGen tarkvara (Marttinen *et al.*, 2012), mille

jooksutamisel valiti iteratsioonide arvuks 15, permutatsioonide arvuks 20 ning statistilise olulisuse piiriks 0.05. Leitud rekombinantsed segmendid maskeeriti skriptiga `bng-mask_recombination.pl` (Seemann, 2014) ning puu arvutati programmiga RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2014), kasutades parameetreid `-m GTRGAMMA` ja `-p 12345`. Puu visualiseerimiseks kasutati programmeerimiskeele R (R Core Team, 2013) `ggtree` paketti (Yu *et al.*, 2017).

2.3 Tulemused

Tabel 4. Koondtabel leitud mutatsioonidest.

Mutatsioon	Antibiootikum, mille resistentsusega mutatsiooni seostati	Mutatsiooni omavate tüvede arv	Mutatsiooniga tüvede MIC väärtused (mg/l)
<i>parC</i> c.260C>T (p. Ser87Leu)	tsiprofloksatsiin	16	2 x >32; 12 x 32; 2 x N/A
<i>parC</i> c.260C>G (p. Ser87Trp)	tsiprofloksatsiin	1	32
<i>parC</i> c.271G>A (p. Glu91Lys)	tsiprofloksatsiin	5	3 x 32; 8; 0,5
<i>gyrA</i> c.248C>T (p. Thr83Ile)	tsiprofloksatsiin	52	2 x >32; 21 x 32; 5 x 16; 2 x 12; 2 x 8; 6; 4 x 4; 2 x 2; 1; 0,5; 11 x N/A
<i>gyrA</i> c.259G>T (p. Asp87Tyr)	tsiprofloksatsiin	2	2 x 32
<i>gyrA</i> c.259G>A (p. Asp87Asn)	tsiprofloksatsiin	1	>32
ParB tüüpi nukleasset domääni sisaldava transk. regulaatori geeni c.1496G>T (p. Val496Phe)	imipeneem	9	7 x 32, 2 x N/A
Lys perekonna transk. regulaatori geeni c.706C>T (p. Pro236Ser)	imipeneem	8	8 x 32
Klass 1 integron	tobramütsiin, gentamütsiin	10	tobramütsiin (5 x 4; 3 x 3; 2 x 2), gentamütsiin (2 x 256; 128; 96; 2 x 64; 48; 2 x 24; 12)
<i>nalC</i> ΔC36-46/48	amikatsiin, tsefepiim, tseftasidiim, tsiprofloksatsiin, tobramütsiin	2	amikatsiin ja tsefepiim (2 x 256), tseftasidiim (32; 256), tsiprofloksatsiin (2 x 32), tobramütsiin (8; 16)

2.3.1 K-meeride filtreerimine

Tabel 5. K-meeride arv antibiootikumiresistentsusmarkeritele viitavate k-meeride filtreerimise erinevates etappides.

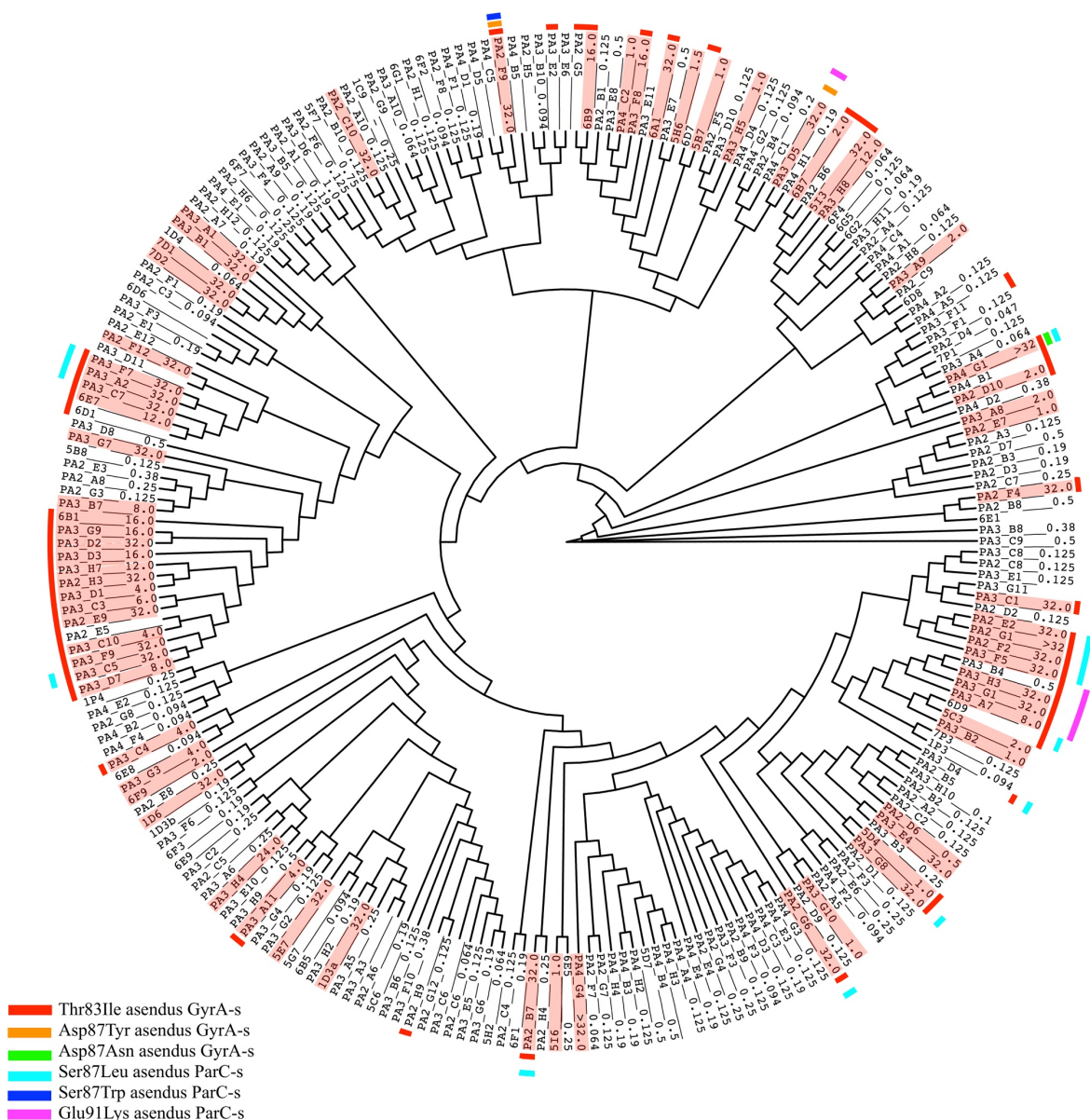
Antibiootikum	Erinevate 16-meeride arv resistentsus-markerite otsimiseks kasutatud genoomides	16-meeride arv, millele Welch-i t-statistiku väärtus	16-meeride arv, mille Welch-i t-statistiku väärtus oli statistiliselt oluline ja 16-meeri sisaldavate tüvede keskmine log(MIC) > 16-meeri mitte sisaldavate tüvede keskmine log(MIC)	16-meeride arv, mille Welch-i t-statistiku väärtus oli statistiliselt oluline ja 16-meeri sisaldavate tüvede keskmine log(MIC) < 16-meeri mitte sisaldavate tüvede keskmine log(MIC)
Tseftasidiim	36 710 045	19 444 248	172 171	409 713
Tsefepiim	36 925 136	19 796 419	97 829	843 835
Tsiprofloksatsiin	37 006 292	19 815 204	554 528	665 688
Piperatsilliin/tasobaktaam	36 987 148	19 810 610	122 963	442 823
Meropeneem	37 040 081	19 866 704	350 200	115 148
Amikatsiin	36 834 537	19 673 975	51 838	274 038
Gentamitsiin	37 060 760	19 958 190	519 357	214 259
Tobramütsiin	36 502 119	19 297 397	74 302	767 940
Kolistiin	36 708 373	19 486 911	30 250	27 655
Imipeneem	36 589 611	19 199 763	550 212	760 529

2.3.2 Tsiprofloksatsiiniresistentsuse genoomsed markerid

Tsiprofloksatsiiniresistentsuse markeritena tõi k-meeridel põhinev töövoog välja mutatsioonid kahes tsiprofloksatsiini (ja teiste kinoloonide) sihtmärkvalke kodeerivas geenis - *parC*-s ja *gyrA*-s. Nendelt geenidelt kodeeritavad ensüümid ParC ja GyrA kuuluvad tüüp II DNA topoisomeraaside ehk topoisomeraas IV ja DNA güraas koosseisu. DNA güraas katalüüsib bakterite kovalentselt seotud tsirkulaarse DNA negatiivset spiraliseerumist ja seega on see ensüüm vajalik DNA topoloogia säilimisel. Topoisomeraas IV on vajalik kromosoomide lahtiühendamisel pärast DNA replikatsiooni (Bagel *et al.*, 1999). Mutatsioonid nendes geenides on tuntud *P. aeruginosa* kinolooniresistentsuse põhjustajad (Jalal ja Wretling, 1998).

Kõik tuvastatud *parC* c.260C>T/G (p. Ser87Leu/Trp) mutatsioonid esinesid koos *gyrA* c.248C>T (p. Thr83Ile) mutatsioonidega ning kõik neid kahte mutatsiooni omavad tüved olid tsiprofloksatsiini suhtes kõrge resistentsusega. *parC* c.271G>A (p. Glu91Lys) mutatsioonid

esinesid koos *gyrA* c.248C>T (p. Thr83Ile) mutatsioonide või *gyrA* c.259G>T (p. Asp87Tyr) mutatsiooniga. Glu91Lys mutatsioon esines koos Asp87Tyr mutatsiooniga ka ühes madala tsiprofloksatsiiniresistentsusega tüves. Samas leidus ka ainult *gyrA* c.248C>T mutatsiooni omavaid kõrge tsiprofloksatsiiniresistentsusega tüvesid.



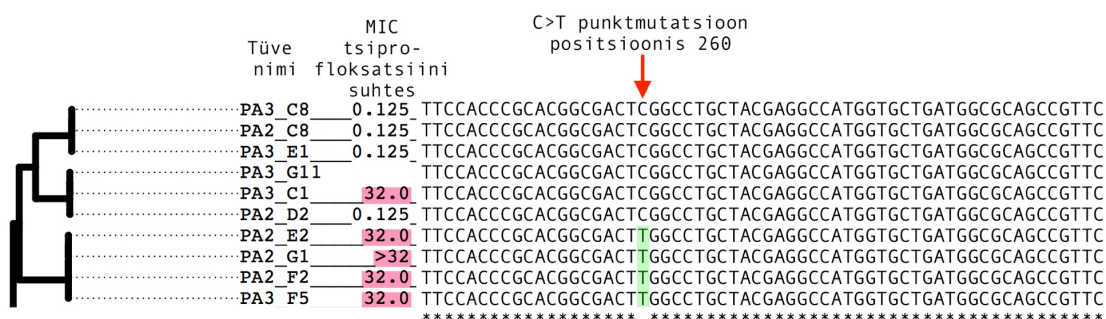
Joonis 7. Tsiprofloksatsiiniresistentsusega seostatud mutatsioone omavate tüvede paiknemine kladogrammil. Puu välimiste sõlmede juurde on märgitud vastavad tüvede nimetused ja nende MIC-d tsiprofloksatsiini suhtes (mg/l). Roosa taustaga on märgitud tsiprofloksatsiiniresistentsed tüved - MIC > 0,5 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

Lisaks nimetatud mutatsioone sisaldavatele tüvedele leidus lähteandmete hulgas veel 36 tüve mille MIC väärtus tsiprofloksatsiini suhtes oli >0,5 mg/l (sh 13 tüve MIC väärtusega >=32 mg/l) ja mis olid seega samuti EUCAST-i murdepunktide (The European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) järgi käsitletavat tsiprofloksatsiiniresistentsetena, kuid kirjeldatud mutatsioone nendes tüvedes ei leidunud.

2.3.2.1 Mutatsioonid DNA topoisomeraas IV subühik A (*parC*) geenis

16 tüve omasid topoisomeraas IV subühik A (*parC*) kodeeriva ala 260. nukleotiidi C>T transitsiooni (joonis 8), mis toob kaasa Ser87Leu asenduse ParC aminohappelises järjestuses. Nendest 16-st tüvest 14-le oli mõõdetud MIC väärtus tsiprofloksatsiini suhtes ning kõik need 14 tüve olid EUCAST murdepunktide (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) alusel tsiprofloksatsiiniresistentsed (MIC > 0,5 mg/l).



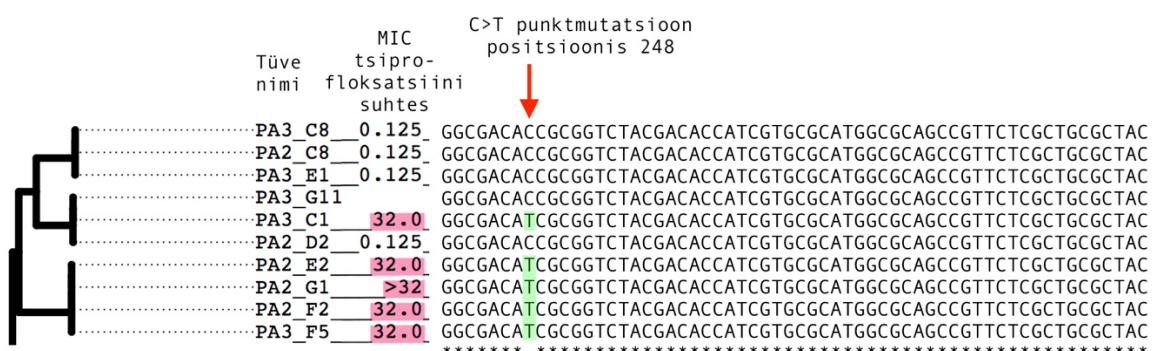
Joonis 8. Fülogeneetilise puu lõik koos *parC* c.260C (metsiktüüpi) ja c.260C>T mutatsiooni omavate tüvedega. Roosa taustaga on märgitud tsiprofloksatsiiniresistentsed tüved - MIC > 0,5 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

Piirkonna täpsema uurimise käigus leiti ka üks tüvi, mis omas *parC* kodeeriva ala 260. nukleotiidi C>G transversiooni, ning 5 tüve, mis omasid *parC* kodeeriva ala 271. nukleotiidi G>A transitsiooni. *parC* c.260C>G toob kaasa Ser87Trp ning *parC* c.271G>A toob kaasa Glu91Lys asenduse ParC ah järjestuses. *parC* c.260C>G asendusega tüvi ning 5-st *parC* c.271G>A asendusega tüvest 4 olid EUCAST murdepunktide alusel (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) tsiprofloksatsiiniresistentsed (MIC > 0,5 mg/l).

parC c.260 positsioonis ja c.271 positsioonis metsiktüüpi nukleotiide omanud 180 tüve keskmine MIC tsiprofloksatsiini suhtes oli 4,6 mg/l. *parC* c.260 või c.271 positsioonis mutatsiooni ja mõõdetud MIC väärtust omanud 19 tüve keskmine MIC oli >29,0 mg/l. Kirjeldatud mutatsioonidega tüvesid leidis fülogeneetilise puu mitmetes harudes (vt joonis 7).

2.3.2.2 Mutatsioon DNA güräasi subühik A (*gyrA*) geenis

52 tüve omasid güräasi subühik A (*gyrA*) kodeeriva ala 248. nukleotiidi C>T transitsiooni (joonis 9), mis toob kaasa Thr83Ile asenduse GyrA aminohappelises järjestuses. Nendest 52-st tüvest oli MIC väärtus mõõdetud 41-le tüvele ning 40 tüve olid EUCASTi murdepunktide alusel (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) tsiprofloksatsiini suhtes resistentsed (MIC > 0,5 mg/l).

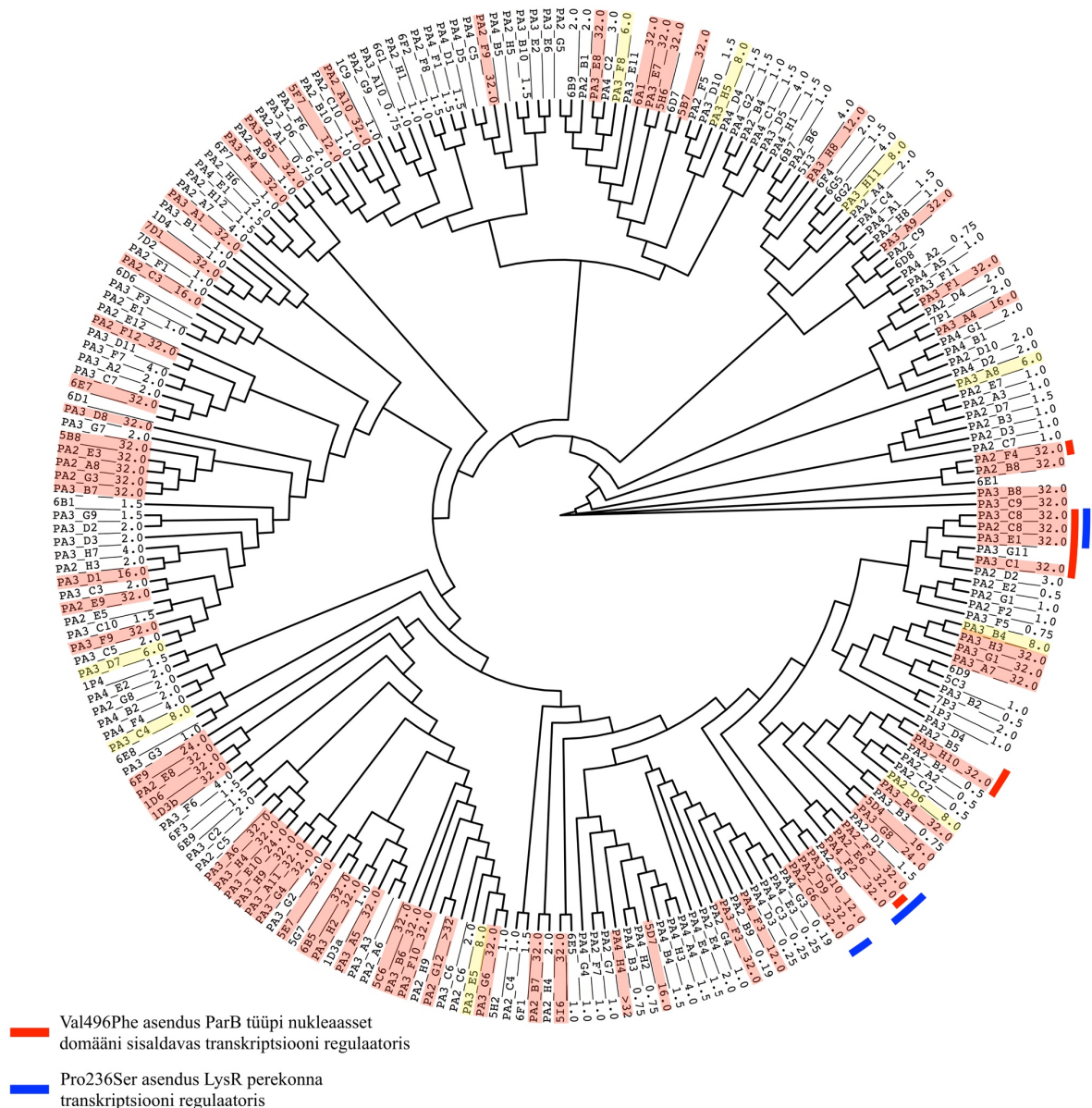


Joonis 9. Fülogeneetilise puu lõi koos *gyrA* c.248C (metsiktüüpi) ja c.248C>T mutatsiooni omavate tüvedega. Roosa taustaga on märgitud tsiprofloksatsiiniresistentsed tüved - MIC > 0,5 mg/l (vastavalt EUCASTi murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

Piirkonna täpsema uurimise käigus leiti lisaks kaks tüve, mis omasid güräasi subühik A (*gyrA*) kodeeriva ala 259. nukleotiidi G>T transversiooni ja üks tüvi, mis omas kirjeldatud positsioonis G>A transitsiooni. G>T transversioon selles positsioonis toob kaasa Asp87Tyr asenduse GyrA aminohappelises järjestuses. G>A transitsioon toob kaasa Asp87Asn asenduse GyrA aminohappelises järjestuses. Need kolm tüve olid samuti EUCASTi murdepunktide alusel (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) tsiprofloksatsiini suhtes resistentsed (MIC > 0,5 mg/l).

gyrA c.248 positsioonis ja c.259 positsioonis metsiktüüpi nukleotiide omanud 159 tüve keskmine MIC tsiprofloksatsiini suhtes oli 3,2 mg/l. *gyrA* c.248 positsioonis või c.259 positsioonis mutatsiooni ja mõõdetud MIC väärtust omanud 42 tüve keskmine MIC oli >21,7 mg/l. Mutatsiooniga tüvesid leidis fülogeneetilise puu mitmetes harudes (vt joonis 7).

2.3.3 Imipeneemiresistentsuse genoomsed markerid

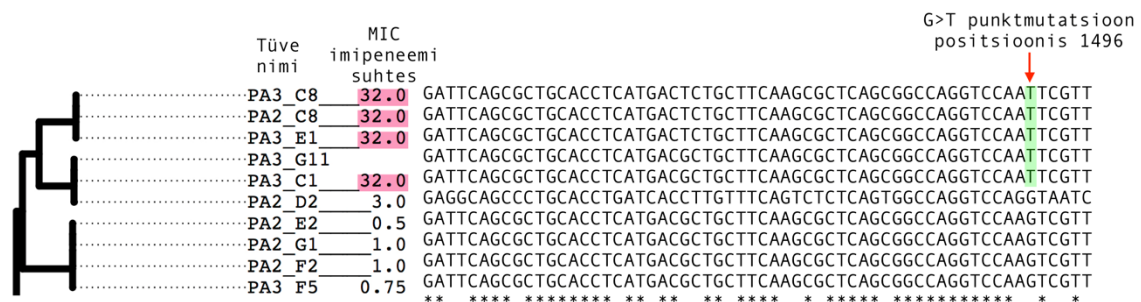


Joonis 10. Imipeneemiresistentsusega seostatud mutatsioone omavate tüvede paiknemine kladogrammil. Puu välimiste sõlmede juurde on märgitud vastavad tüvede nimetused ja nende MIC-d imipeneemi suhtes (mg/l). Roosa taustaga on märgitud imipeneemiresistentsed tüved - MIC > 8 mg/l. Kollase taustaga on märgitud imipeneemi suhtes keskmiselt resistentsed tüved - MIC > 4 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

2.3.3.1 Mutatsioon transkriptsiooniregulaatori geenis

9 tüve omasid ParB tüüpi nukleaasset domääni sisaldava transkriptsiooniregulaatori geeni kodeeriva ala 1496. nukleotiidi G>T transversiooni (joonis 11), mis toob kaasa Val496Phe asenduse vastava transkriptsiooniregulaatori aminohappelises järjestuses. Nendest 9-st tüvest oli MIC väärtus mõõdetud 8-le tüvele ning 7 tüve olid EUCASTi murdepunktide alusel (The

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) imipeneemi suhtes resistentsed (MIC > 8 mg/l).

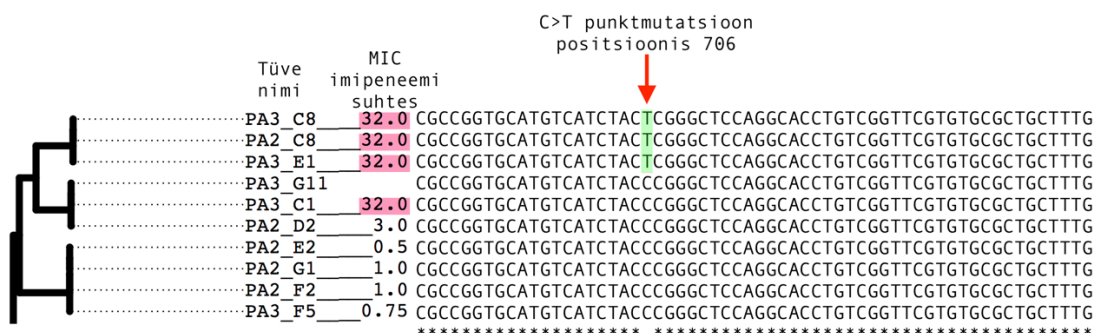


Joonis 11. Fülogeneetilise puu lõik koos parB tüüpi nukleasset domääni sisaldava transkriptsiooniregulaatori c.1496G (metsiktüüpi) ja c.1496G>T mutatsiooni omavate tüvedega. Roosa taustaga on märgitud imipeneemiresistentsed tüved - MIC > 8 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktile (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

184 tüve, kust kirjeldatud mutatsiooni ei tuvastatud, keskmine MIC tsiprofloksatsiini suhtes oli 11,9 mg/l. Transkriptsiooniregulaatori c.1496G>T mutatsiooni ja imipeneemi suhtes mõõdetud MIC väärtust omanud 7 tüve keskmine MIC oli 32,0 mg/l. Mutatsiooniga tüvesid leidis fülogeneetilise puu erinevates ja ka üksteisest kaugel asuvates harudes. Sealjuures on leidub ka haru, kus kõik kõrge resistentsusega tüved (PA3_C8, PA2_C8, PA3_E1, PA3_C1) omavad mutatsiooni kirjeldatud positsioonis ning kõik madala resistentsusega tüved (PA2_D2, PA2_E2, PA2_G1, PA2_F2, PA3_F5) on kirjeldatud positsioonis mutatsioonita (vt joonis 10).

2.3.3.2 Mutatsioon LysR perekonna transkriptsiooniregulaatori geenis

8 EUCAST murdepunktide alusel (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) imipeneemiresistentset tüve (MIC > 8 mg/l), omasid LysR perekonna transkriptsiooniregulaatori geeni kodeeriva ala 706. nukleotiidi C>T transitsiooni (joonis 12), mis toob kaasa Pro236Ser asenduse vastava LysR perekonna transkriptsiooniregulaatori aminohappelises järjestuses.



Joonis 12. Fülogeneetilise puu lõik koos LysR perekonna transkriptsiooniregulaatori c.706C (metsiktüüpi) ja c.706C>T mutatsiooni omavate tüvedega. Roosa taustaga on märgitud imipeneemiresistentsed tüved - MIC > 8 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

185 tüve, kust kirjeldatud mutatsiooni ei tuvastatud, keskmine MIC imipeneemi suhtes oli 11,9 mg/l. Lys perekonna transkriptsiooniregulaatori c.706C>T mutatsiooni omanud 8 tüve keskmine MIC oli 32,0 mg/l. Mutatsiooniga tüvesid leidis fülogeneetilise puu erinevates harudes (vt joonis 10).

2.3.3.3 Mutatsioonid välismembraani poriini *oprD* geenis

Tabel 6. Näited *oprD* geenis leidunud mutatsioonidest.

Mutatsioon	Tüved, milles mutatsioon leidis ja nende MIC-id imipeneemile
ΔT667-G679	PA3_H8 (MIC 12,0 mg/l)
610_611insC	PA3_G8 (MIC 24,0 mg/l); 5D4 (MIC N/A)
461_462insCCTGTTC	PA3_F9 (MIC 32,0 mg/l)
ΔC74-G90	5H6 (MIC 32,0 mg/l)
ΔT209-A221	PA3_E7 (MIC 32,0 mg/l)
ΔT865	PA3_D8 (MIC 32,0 mg/l)
714_715insAA	PA3_C8 (32,0 mg/l)
ΔA334	PA3_C1 (MIC 32,0 mg/l)
ΔT1073	PA3_B5 (MIC 32,0 mg/l)
ΔG1150	PA2_H9 (MIC N/A)
ΔC435	PA2_G3 (MIC 32,0 mg/l) ja 6D7 (MIC N/A)
ΔG676	5B8 (MIC 32,0 mg/l)
<i>oprD</i> kahe osana, osade vahe >6 kbp	6F9 (MIC 24,0 mg/l)

Oli teada, et imipeneemiresistentsuses mängivad sageli rolli mutatsioonid välismembraani poriini kodeerivas *oprD* geenis. Siiski selle geeniga seotud tulemused puudusid. Siinkohal viidi läbi erinevate tüvede *oprD* geenide joondamine ning tuvastati imipeneemiresistentsetest tüvedest mitmeid mutatsioone (vt tabel 6). Kuna need mutatsioonid esinesid vaid ühes

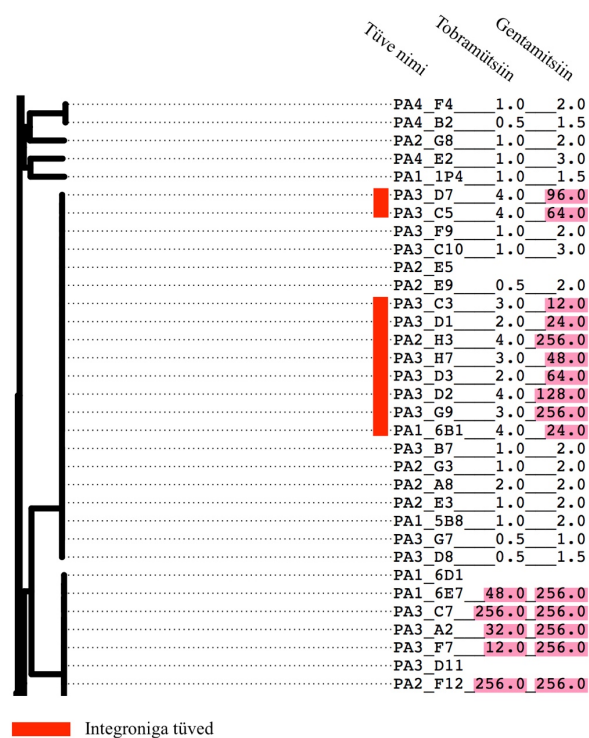
imipeneemiresistentsuse markerite tuvastamisel kasutatud tüves, siis ei olnudki nad töövoo poolt tuvastatavad.

2.3.4 Tobramütsiini- ja gentamütsiiniresistentsuse genoomsed markerid

Kümme fülogeneetilise puu ühes harus paiknevat tüve omasid (ilmselt plasmiidis paiknevat) ~20000 nukleotiidi pikkust klass 1 integroni, mis hõlmas endas 21 erinevat geeni. Nende kümne tüve MIC tobramütsiini ja gentamütsiini suhtes oli kõrgem, kui ülejäänud kümnel samas harus oleval, kuid integroni mitte omaval tüvel (vt joonis 13).

Integron sisaldas endas geene:

- klass 1 integroni integraas
- oksatsilliini hüdrolüüsiv klass D β -laktamaas OXA-10
- sulfoonamiidi resistentsus dihidropteraadi süntaas Sul1
- GNAT perekonna N-atsetültransferaas
- transpositsioonivalk TniB
- transpositsioonivalk TniA
- EAL domääni sisaldav valk
- elavhõbeda transporter MerE
- elavhõbedaresistentsuse transkriptsiooniregulaator MerD
- elavhõbedaiooni reduktaas
- elavhõbeda transporter MerC
- elavhõbeda transporter periplasmaatiline komponent MerP
- elavhõbeda ioonide transporter MerT
- MerR perekonna transkriptsiooni regulaator
- transposaas
- TetR perekonna transkriptsiooni regulaator
- tetratsükliiniresistentsuse MFS väljavoolupump
- multiravimi transporter
- transposaas
- polüketiidi tsüklaas



Joonis 13. Tobramütsiini- ja gentamütsiiniresistentsusega seotud integroni omavate tüvedega fülogeneetilise puu haru. Puu välimiste sõlmede juurde on märgitud vastavad tüvede nimetused ja nende MIC-d tobramütsiini ja gentamütsiini suhtes. Roosa taustaga on märgitud resistentsed tüved - MIC > 4 mg/l (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

2.3.4.1 Integroni omavate tüvede resistentsus tobramütsiinile

EUCAST murdepunktide alusel (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) olid kõik 10 integroni omavat tüve tobramütsiini suhtes tundlikud (MIC < 4 mg/l). Siiski olid nende MIC väärtused kõrgemad, kui samas harus paiknevad 10 integroni mitte sisaldavat tüve.

Integroniga tüvede keskmine MIC tobramütsiini suhtes oli 3,3 mg/l. Samas harus paiknevate ilma integronita tüvede keskmine MIC tobramütsiini suhtes oli 0,95 mg/l. Welch'i t-statistiku p-väärtus <0,0001 (valim I - kümne integroni omava tüve MIC väärtused, valim II - kümne integroni mitte-omava tüve MIC väärtused). Kõikide ilma integronita tüvede keskmine MIC oli 20,1 mg/l (mitmed kõrge resistentsusega tüved).

2.3.4.2 Integroni omavate tüvede resistentsus gentamitsiinile

Kuigi gentamitsiini puhul kirjeldatud integroniga seotud k-meerid ei saavutanud statistiliselt olulist t-testi p-väärtust, oli lähteandmetest näha, et kirjeldatud integroni omanud 10 tüve olid ka gentamitsiini suhtes resistentsemad, kui 10 samas harus paiknenud integroni mitte omanud tüve.

Kõik integroni omavad tüved olid EUCAST murdepunktide (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) alusel gentamitsiiniresistentsed (MIC > 4 mg/l). Integroniga tüvede keskmine MIC gentamitsiini suhtes oli 97,2 mg/l. Samas harus paiknevate ilma integronita tüvede keskmine MIC gentamitsiini suhtes oli 1,95 mg/l. Welch'i t-statistiku p-väärtus 0,0089 (valim I - kümne integroni omava tüve MIC väärtused, valim II - kümne integroni mitte-omava tüve MIC väärtused). Kõikide ilma integronita tüvede keskmine MIC oli 20,7 mg/l.

2.3.5 Multiresistentsust põhjustav mutatsioon *nalC*-s

Tüvedes PA3_D5 ja PA2_F9 esines RND väljavoolupumba operoni *mexAB-oprM* negatiivse regulaatori *nalC* geeni (Cao *et al.*, 2004) alguses raaminihet põhjustav deletsioonid (Δ C36-C46 tüves PA3_D5 ja Δ C36-C48 tüves PA2_F9). Mõlemad tüved olid resistentsed antibiootikumidele amikatsiin, tsiprofloksatsiin, tseftasidiim, tsefepiim ja tobramütsiin (vt joonis 14).

Tüve nimi	Tseftasidiim	Tsefepiim	Amikatsiin	Tsiprofloksatsiin	Tobramütsiin	Deletsioon
PA4_G2	1.0	1.0	3.0	0.125	0.25	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA2_B4	2.0	1.5	8.0	0.094	1.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA4_C1	1.5	1.5	6.0	0.2	1.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA3_D5	256.0	256.0	256.0	32.0	8.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGG-----GCGCGCCATGCTC
PA4_H1	2.0	1.5	6.0	0.19	0.5	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA2_F8	2.0	2.0	4.0	0.125	1.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA4_F1	1.5	1.5	3.0	0.125	0.38	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA4_D1	1.5	1.0	6.0	0.19	1.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA4_D5						ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA4_C5						ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA2_F9	32.0	256.0	256.0	32.0	16.0	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGG-----CGCGCCATGCTC
PA4_B5						ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA2_H5						ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC
PA3_B10	0.75	1.0	2.0	0.094	0.25	ATGAACGATGCTTCTCCCGTCTGACCGAACGCGGCAGGCAACGCCGCCGCGCCATGCTC

Joonis 14. Fülogeneetilise puu lõigud koos *nalC* geenis deletsioone omavate tüvedega. Roosa taust - vastava antibiootikumi suhtes resistentne tüvi (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

2.4 Arutelu

Aastakümneid on resistentsuse vastu võideldud uute antibiootikumide välja töötamisega. Siiski pole selle strateegiaga kaua kestvat edu saavutatud - resistentsus on tekkinud kiiresti iga uue antibiootikumi suhtes (joonis 1). Üha karmimate regulatoorsete tingimuste ning majandusliku ebaefektiivsuse tõttu on aga uute antibiootikumide väljatöötamine peaaegu lakanud (Ventola, 2015).

Käesoleval ajal, mil kirjeldatud asjaolude tõttu on antibiootikumiresistentsus taas tõusnud üheks suurimaks ohuks inimkonna tervisele, on väärtuslikud kõik uudsed lahendused, mis võimaldaksid heita pilku antibiootikumiresistentsuse tagamaadele ning aitaksid seega laialt levinud (multi)resistentsusega toime tulla ja selle levikut ohjata.

Tehnoloogia arengust tulenevalt lihtsustub ja odavneb pidevalt sekveneerimisprotsess ning kasvab sekveneeritud bakterigenoomide arv. Omades piisavat hulka bakterigenoome ning nendele genoomidele vastavaid resistentsusväärtuseid, saab läbi viia juht-kontroll uuringu, tuvastamaks antibiootikumiresistentsuse genoomseid markereid. Uute resistentsust põhjustavate geenide ja mutatsioonide identifitseerimine aitab paremini mõista bakteri resistentsusmehhanisme, kontrollida efektiivsemalt infektsioonide levikut, disainida uusi DNA põhiseid teste resistentsete fenotüüpide tuvastamiseks ja seega optimeerida antibiootikumikuure (Bakour *et al.*, 2016). Sealjuures võib tehnoloogia arenedes osutada efektiivseks lahenduseks antimikroobse tundlikkuse hindamine otse WGS andmetest (Lee ja Behr, 2016), mille tundlikkus sõltub sellest kui palju on teada resistentsetele fenotüüpidele vastavaid nukleiinhappepõhiseid markereid (Ledeboer ja Hodinka, 2011).

Käesolevas magistritöös loodi k-meeridel põhinev töövoog, mis abil tuvastati bakteris *P. aeruginosa* resistentsusega seotud markereid. Töövoog tuvastab Welch'i t-testi abil k-meere, mida sisaldavate tüvede keskmine MIC erineb statistiliselt oluliselt k-meeri mitte sisaldavate tüvede keskmisest MIC-st. Järgnevalt grupeerib töövoog järjestiku paiknevad k-meerid ning annoteerib k-meerid läheduses paiknevate geenide põhjal. Töövoo rakendusvõimalused ei piirdu liigiga *P. aeruginosa* ega ka resistentsusmarkerite otsimisega, vaid see on rakendatav erinevatele liikidele ning ükskõik milliste mõõdetavate fenotüüpide genoomsete markerite tuvastamiseks.

Erinevalt programmist Kover, mis tuvastab vaid minimaalse hulga fenotüüpi ennustavaid k-meere, toob antud töövoog välja kõik statistiliselt olulised potentsiaalsete resistentsusmarkeritega seotud k-meerid. Võrrelduna programmiga SEER, mis võimaldab samuti Welch'i t-testi abil tuvastada resistentsete tüvedega seotud k-meere, ei vaja loodud metoodika, põhinedes k-meeride loendamisel Genomtester4 programmpaketi programmidel (Kaplinski *et al.*, 2015), nii suure muutmälu mahuga serveri olemasolu. Seega on loodud metoodikat võimalik kasutada laiemal sihtrühmal inimestel ning seda eriti juhul, kui kasutada lähteandmetena toorlugemeid. Erinevalt SEER-ist teostab loodud töövoog ka k-meeride automaatse referentsivaba annoteerimise ning väljundtabelis kajastuvad k-meeri sisaldavate ja mitte-sisaldavate tüvede keskmised ning maksimaalsed MIC väärtused, mis hõlbustab järgnevat oluliste mutatsioonide tuvastamist. Samuti esines programmi SEER rakendamisel tõrkeid - sarnaste sisendandmete kasutamisel programm ühtede andmete puhul töötas, teiste puhul mitte.

Kuigi näiteks bakterite *S. aureus* ja *M. tuberculosis* puhul suudetakse nende resistentsust mitmetele antibiootikumidele määrata kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega (Bradley *et al.*, 2015), siis uuritud bakteriliigi *P. aeruginosa* resistentsuse määramine genoomsete markerite põhjal on jätkuvalt väljakutseks. Seda eriti asjaolu tõttu, et selles bakteris tekib antibiootikumiravi jooksul pidevalt uusi resistentsust põhjustavaid kromosomaalseid mutatsioone. Lisaks spontaansetele kromosomaalsetele mutatsioonidele mängivad *P. aeruginosa* resistentsuses rolli ka mobiilsete geneetiliste elementide koosseisus levivad resistentsusgeenid (Lister *et al.*, 2009).

Eelduste kohaselt pidi loodud töövoog suutma tuvastada sagedasi (vähemalt kahes uuringus kasutatud tüves leiduvaid) ning tugeva efektiga resistentsust põhjustavaid mutatsioone ning vastavalt eeldustele tõigi töövoog selgelt esile teadaolevad ja sagedased kõrgetasemelise fluorokinolooni resistentsusega seotud mutatsioonid *parC* ja *gyrA* geenides ning multiresistentsusega seotud deletsiooni *nalC* geenis. Lisaks nendele tuntud mutatsioonidele leiti aminohappelisi muutuseid põhjustavad mutatsioonid mitmete imipenemiresistentsete tüvede LysR perekonna ja ParB nukleaasset domääni sisaldavate transkriptsiooni regulaatorite geenidest. Veel tõi töövoog välja 21 geenikassetiga klass 1 integroni, mida omavatel tüvedel oli kõrgem resistentsus tobramütsiinile, kui samas fülogeneetilise puu harus paiknevatel ilma integronita tüvedel. Lähteandmetest oli täheldatav ka integroniga tüvede kõrgem gentamitsiiniresistentsus, võrrelduna samas fülogeneetilise puu harus asuvate integroni mitte omavate tüvedega. Samas gentamitsiiniga läbi viidud analüüsil ei saavutanud integroniga

seotud k-meerid mitmese testimise korrektsiooni läbimiseks piisavalt madalat t-testi p-väärtust.

Seega oli k-meeridel põhineva analüüsi võimekusele kohaselt tulemusi, mis olid seotud nii ühe nukleotiidi mutatsioonidega kui ka tervete geenide lisandumisega (integron) ja nii tuumgenoomis kui ka lisandgenoomis leiduvate mutatsioonidega (integron). *parC* ja *gyrA* geenides leiduvate tuntud tsiprofloksatsiiniresistentsust põhjustavate mutatsioonidega (Lee *et al.*, 2005) seotud k-meeride ning *nalC* geenis leiduva multiresistentsusega seotud deletsiooni (Cao *et al.*, 2004) esiletulek töövoa rakendamisel demonstreerib töövoa ootuspärast toimimist. Kuna kirjandusest ei leitud andmeid töövoa rakendamisel välja tulnud transkriptsiooni regulaatorites leiduvate mutatsioonide ja *P. aeruginosa* imipeneemiresistentsuse vahelise seose kohta, siis võib neid mutatsioone pidada uuteks potentsiaalseteks imipeneemiresistentsuse markeriteks. Samuti ei leitud kirjandusest andmeid ühegi integronis leiduva geeni ja tobramütsiini- ning gentamütsiiniresistentsuse vahelise seose kohta. Seetõttu võib oletada, et nende integroni geenide seas leidub geen, mille seos kõrgeimale tobramütsiini- ning gentamütsiiniresistentsusega on täpsemalt kirjeldamata ning mida võiks tobramütsiini- ning gentamütsiiniresistentsuse genoomipõhisel hindamisel arvesse võtta. Samas võis tobramütsiini- ja gentamütsiiniresistentsust põhjustada ka mingi muu integroni läheduses paiknev geen. Näiteks paiknes 10-st integroni omanud tüvest 8-l integronist ülesvoolu vaid neile omane aminoglükosiid-3'-fosfotransferaasi (APH) geen, mille seos aminoglükosiidiresistentsusega on teada, kuid millega seotud k-meerid ei saavutanud statistiliselt olulist t-testi p-väärtust.

Käesoleva magistr töö tulemuste põhjal ei saa väita, et leitud transkriptsiooni regulaatorite geenides paiknevate ühe nukleotiidi mutatsioonide või integroni ja antibiootikumiresistentsuse vahel on ka tegelik põhjuslik seos. Sellise seose kinnitamiseks tuleks läbi viia laboratoorsed katsed, kus tundlikkusse bakteritüvesse viiakse sisse, kas vastav mutatsioon või integron ja mõõdetakse ning võrreldakse modifitseeritud ja modifitseerimata bakterite MIC väärtuseid. Loodud meetodika võimaldabki ühtlasi selekteerida välja huvitavamaid mutatsioonide kandidaate laboratoorseks testimiseks.

Kuigi analüüsi käigus leiti juba varem kirjeldatud ning potentsiaalseid uusi resistentsusmärkeid, tuleb tõdeda, et enamiku antibiootikumiresistentsuse juhtude puhul (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)) jäid resistentsust põhjustada võivad mutatsioonid leidmata.

Kokku oli kümne antibiootikumiga 419 resistentsuse juhtu (EUCAST murdepunktide kohaselt), millest vaid 78-le leiti võimalik genoomne põhjus. Sealjuures suudeti kõige enam leida tsirpofloksatsiiniresistentsuse genoomseid põhjuseid (52/75).

Põhjus, miks 343 juhul jäi antibiootikumiresistentsuse võimalikude genoomsed põhjused tuvastamata, võib seisneda resistentsuse tulenemisest mitmetest väikese efektiga mutatsioonidest ehk mutatsioonide komplektist. Sealjuures võib üksik mutatsioon sellest komplektist esineda nii tundlikes kui resistentsetes tüvedes ning seega ei ole töövoos poolt tuvastatav. Samuti võib resistentsus tuleneda ühest suure efektiga kromosomaalsest mutatsioonist, mis on unikaalne vaid ühele uuringus kasutatud resistentsele tüvele ning mis seega ei ole samuti töövoos poolt tuvastatav. Sellised mutatsioonid võivad asuda näiteks välismembraani poriini kodeerivas *oprD* geenis, kromosomaalset tsefalosporinaasi kodeerivas *ampC* geenis ning RND perekonna väljavoolupumpade negatiivseid regulaatoreid kodeerivates geenides (Lister *et al.*, 2009). Tõepoolest, *oprD* geeni kontroll näitas, et mitmetes imipeneemi suhtes resistentsetes tüvedes leidis (uuringus kasutatud tüvede lõikes) vaid neile unikaalne mutatsioon. Veel võib nende bakterite resistentsus tuleneda resistentsusega seotud geenide koopiaarvu muutustest, mille tuvastamiseks oleks vaja arvestada k-meeride sagedusi. Kuna antud töös kasutatud töövoog arvestas vaid k-meeride olemasolu ja puudumist, siis ei olnud ka sellised koopiaarvu variatsioonid tuvastatavad.

Resistentsusega seotud k-meeride tuvastamist võisid segada resistentsusega seotud mutatsiooni läheduses (lähemal kui k-1 nukleotiidi) paiknevad resistentsusega mitte seotud varieeruvad saidid. Selle asjaolu leevendamiseks, eelistati läbi testitud k-meeri pikkustest, milleks olid 16-meerid ja 25-meerid, kasutada esimest varianti. Ühes genoomses positsioonis paiknevate resistentsusega seotud mutatsioonide leidmise tõenäosust võis vähendada ka asjaolu, et töövoog ei summeerinud kokku resistentsusjuhtumeid, mis ei tulenenud ühest konkreetsest mutatsioonist, vaid tulenesid metsiktüüpi järjestuse puudumisest (nt metsiktüüpi A nukleotiidi asendumine ükskõik millise teise nukleotiidiga). Samuti võis huvitavaid mutatsioone jääda tulemustest välja, kuna nendega seotud k-meeride t-testi p-väärtus ei olnud piisavalt väike mitmese testimise korrektsiooni läbimiseks (nagu oli näha gentamitsiini analüüsil integroniga seotud k-meeridelt).

Hetkel ei arvesta töövoog resistentsusega seotud mutatsioonide leidmisel klonaalset populatsiooni struktuurist tulenevat segavat efekti. Sellest tulenevalt oli kümneid tuhandeid tulemusi, mis olid seotud vähestes (näiteks kahes) kõrge või madala resistentsusega

fülogeneetiliselt lähedases tüves leiduva variatsiooniga ja mis raskendasid resistentsuse seisukohalt oluliste variatsioonide leidmist. Valdav osa töövooga saadud tulemustest olid seotud sünonüümsete mutatsioonidega, mistõttu hõlbustaks märkimisväärsete tulemuste leidmist oluliselt juurdearendus, mis võimaldaks välja filtreerida mittesünonüümsete mutatsioonidega seotud tulemusi.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö käigus töötati välja k-meeridel põhinev antibiootikumiresistentsuse markerite tuvastamise töövoog, mis kasutab sisendandmetena assambleeritud genoome või toorlugemeid ja nendele vastavaid fenotüübilisi väärtuseid. Töövoog tuvastab Welch'i t-testi abil k-meere, mis on positiivselt või negatiivselt seotud resistentsse fenotüübiga. K-meerid grupeeritakse ja annoteeritakse ning tekitatakse väljundtabel, kuhu on koondatud antibiootikumiresistentsuse markerite tuvastamiseks oluline info.

Töövoogu rakendati Maailma Terviseorganisatsiooni poolt resistentsuse seisukohalt üheks ohtlikumaks bakteriks nimetatud *Pseudomonas aeruginosa*-l, kes on tuntud keerukate resistentsusmehhanismide, multiresistentsuse ja võime poolest arendada välja resistentsus antibiootikumiravi jooksul. Selle tulemusena tuvastati mitmeid tuntud resistentsusega seotud mutatsioone nagu näiteks tsiprofloksatsiiniresistentsust põhjustavad mutatsioonid *parC*-s ja *gyrA*-s ning multiresistentsust põhjustavad deletsioonid *nalC*-s. Lisaks nendele tuntud mutatsioonidele leiti ka potentsiaalseid uusi imipenemiresistentsusega seotud mutatsioone. Nendeks olid aminohappelisi muutuseid põhjustavad mutatsioonid LysR perekonna ja ParB tüüpi nukleaasset domääni sisaldavate transkriptsiooni regulaatorite geenides. Samuti tõi töövoog välja klass 1 integroni, mida omavatel tüvedel oli kõrgeenenud resistentsus tobramütsiinile ja gentamütsiinile.

Kasutatud meetoodika rakendusvõimalused ei piirdu liigiga *P. aeruginosa* ega ka resistentsusmarkerite otsimisega, vaid see on rakendatav erinevatel liikidel ning ükskõik milliste mõõdetavate fenotüüpide genoomsete markerite tuvastamiseks.

K-mer-based detection of antibiotic resistance markers in bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Erki Aun

SUMMARY

Since their discovery in the beginning of 20th century, antibiotics have been widely used by mankind to prevent and cure infectious diseases. At first, antibiotics were considered as miracle drugs. People's life expectancy increased and infectious diseases were thought to be conquered.

Nevertheless, the use of antibiotics became limited by the fast emergence of resistance in bacteria after introducing them. To counteract resistant bacteria, it is important to identify new resistance-associated mutations and genes. This knowledge enables us to better understand the bacterial resistance mechanisms and design new DNA-based assays for detecting resistance phenotype and optimizing the antibiotic therapies.

In this thesis, a k-mer-based resistance marker detection pipeline was designed. The pipeline uses either assembled contigs or raw reads and associated phenotypic data as an input. By using Welch's t-test it detects the k-mers that are positively or negatively associated with resistance phenotype and returns output table with relevant information for detecting the antibiotic resistance markers.

The pipeline was applied to *P. aeruginosa*, which is one of the most dangerous bacteria in terms of resistance, according to WHO. The pipeline discovered some well-known resistance associated mutations such as ciprofloxacin resistance causing mutations in *parC* and *gyrA* and multiresistance causing deletions in *nalC*. In addition to those previously described mutations also some new potential imipenem resistance-associated mutations were discovered. These were nonsynonymous mutations in LysR family transcription regulator gene and ParB-type nuclease domain containing transcription regulator gene. Also, a class 1 integron was in the results, as associated with elevated tobramycin and gentamicin resistance.

Implementation of designed methodology is not limited to *P. aeruginosa* and detection of antibiotic resistance markers. Instead, it can be used on various organisms and for detection of genomic markers for any measurable phenotype.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma magistritöö juhendajat Age Brauer'it asjakohaste nõuannete ja abivalmiduse eest. Samuti täna kõiki teisi bioinformaatika õppetooli liikmeid hea seltskonna ning väärtuslike märkuste ja mõtete jagamise eest. Eraldi täna õppetooli juhatajat professor Mado Remm'i, kes andis mulle võimaluse bioinformaatika õppetoolis magistritöö ja praktika sooritamiseks.

Täna ka oma perekonda, lähedasi, sõpru ja tuttavaid toetuse ning kaasa elamise eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837–840.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10.
- Arias, C. A., Panesso, D., McGrath, D. M., Qin, X., Mojica, M. F., Miller, C., ... Weinstock, G. M. (2011). Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. *The New England Journal of Medicine*, 365(10), 892–900.
- Bagel, S., Hüllen, V., Wiedemann, B., & Heisig, P. (1999). Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 868–875.
- Bakour, S., Sankar, S. A., Rathored, J., Biagini, P., Raoult, D., Fournier, P. E. (2016). Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics, *Future Microbiol*, 11(3), 455-66.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol*, (45), 493–496.W
- Bauer, K. A., West, J. E., Balada-Llasat, J. M., Pancholi, P., Stevenson, K. B., Goff, D. A. (2010). An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/S. aureus blood culture test in patients with S. aureus bacteremia, *Clin Infect Dis.*, 51(9), 1074-80.
- Beno, P., Krcmery, V., Demitrovicova, A. (2006). Bacteraemia in cancer patients caused by colistin-resistant Gram-negative bacilli after previous exposure to ciprofloxacin and/or colistin, *Clin Microbiol Infect*, 12(5), 497-8.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, J. A., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13(1), 42-51.
- Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., ... Perkins, M. D. (2010). Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *The New England Journal of Medicine*, 363(11), 1005–1015.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951.
- Bradley, P., Gordon, N. C., Walker, T. M., Dunn, L., Heys, S., ... , Iqbal, Z. (2015). Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat commun*, 6:10063.

- Brauer, A., Telling, K., Laht, M., Kalmus, P., Lutsar, I., Remm, M., Kisand, V., Tenson, T. (2016). Plasmid with colistin resistance gene *mcr-1* in ESBL-producing *Escherichia coli* strains isolated from pig slurry in Estonia, *Antimicrob Agents Chemother*, 60(11), 6933-6966.
- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance, *Trends Microbiol*, 19(8), 419-26.
- Cambray, G., Guerot, A. M., Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu Rev Genet*, (44), 141-66.
- Cao, L., Srikumar, R., Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719, *Mol Microbiol*, 53(5), 1423-36.
- Card, R., Zhang, J., Das, P., Cook, C., Woodford, N., & Anjum, M. F. (2013). Evaluation of an Expanded Microarray for Detecting Antibiotic Resistance Genes in a Broad Range of Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 458–465.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health, and Human Services. (2013). REPORT—Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1–114.
- Chen, L., Todd, R., Kiehlbauch, J., Walters, M., Kallen, A. (2016). Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* - Washoe County, Nevada, 2016, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 66(1), 33.
- Chen, Z., Niu, H., Chen, G., Li, M., Li, M., & Zhou, Y. (2015). Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 19400–19405.
- Chuanchuen, R., Gaynor, J. B., Karkhoff-Schweizer, R., & Schweizer, H. P. (2005). Molecular Characterization of MexL, the Transcriptional Repressor of the *mexJK* Multidrug Efflux Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1844–1851.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T., & Schweizer, H. P. (2002). The MexJK Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprM for Antibiotic Efflux but Not for Efflux of Triclosan. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5036–5044.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*, 3(9), 541-8.
- Compeau, P. E., Pevzner, P. A., Tseler, G. (2011). How to apply de Bruijn graphs to genome assembly, *Nat Biotechnol*, 29(11), 987-91.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 417–433.
- Davis, J. J., Boisvert, S., Brettin, T., Kenyon, R. W., Mao, C., Olson, R., ... Stevens, R. (2016). Antimicrobial Resistance Prediction in PATRIC and RAST. *Scientific Reports*, 6, 27930.
- Dean, C. R., Visalli, M. A., Projan, S. J., Sum, P.-E., & Bradford, P. A. (2003). Efflux-Mediated Resistance to Tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 972–978.
- Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 808–816.

- Doi, Y., de Oliveira Garcia, D., Adams, J., & Paterson, D. L. (2007). Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo- β -Lactamase SPM-1 in a Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Brazil, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), 852–856.
- Drouin, A., Giguère, S., Déraspe, M., Marchand, M., Tyers, M., Loo, V. G., ... Corbeil, J. (2016). Predictive computational phenotyping and biomarker discovery using reference-free genome comparisons. *BMC Genomics*, 17, 754.
- Dubinkina, V. B., Ischenko, D. S., Ulyantsev, V. I., Tyakht, A. V., & Alexeev, D. G. (2016). Assessment of *k*-mer spectrum applicability for metagenomic dissimilarity analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 38.
- Evans, K., Adewoye, L., & Poole, K. (2001). MexR Repressor of the *mexAB-oprM* Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR Binding Sites in the *mexA-mexR* Intergenic Region. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 807–812.
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 25–64.
- Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F.-J. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 836–871.
- Fournier, P.-E., Dubourg, G., & Raoult, D. (2014). Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Medicine*, 6, 114.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152.
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2836–2840.
- Gao, R., Hu, Y., Li, Z., Sun, J., Wang, Q., Lin, J., ... Feng, Y. (2016). Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathogens*, 12(11), e1005957.
- Giedraitiene, A., Vitkauskiene, A., Naginiene, R., Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanism of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47(3), 137-46.
- Gill, J., Arora, S., Khanna, S., & Kumar, K. H. (2016). Prevalence of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a Tertiary Level Intensive Care Unit. *Journal of Global Infectious Diseases*, 8(4), 155–159.
- Gordon, N. C., Price, J. R., Cole, K., Everitt, R., Morgan, M., Finney, J., ... Golubchik, T. (2014). Prediction of *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Resistance by Whole-Genome Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1182–1191.
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2014). Multiple Mutations Lead to MexXY-OprM-Dependent Aminoglycoside Resistance in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 221–228.
- Gunderson, B. W., Ibrahim, K. H., Hovde, L. B., Fromm, T. L., Reed, M. D., & Rotschafer, J. C. (2003). Synergistic Activity of Colistin and Ceftazidime against Multiantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 905–909.
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., Lam, T. T. Y. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1):28-36.

- Hancock, R.E., Brinkman, F.S. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux, *Annu Rev Microbiol*, (56), 17-38.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 119.
- Jahandideh, S. (2013). Diversity in structural consequences of MexZ mutations in *Pseudomonas aeruginosa*, 81(5), 600-6.
- Jalal, S., Wretling, B. (1998). Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microb Drug Resist*, 4(4), 257-61.
- Jansen, G., Mahrt, N., Tueffers, L., Barbosa, C., Harjes, M., Adolph, G., ... Schulenburg, H. (2016). Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1), 182–194.
- Jenkins, S. G., & Schuetz, A. N. (2012). Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(3), 290–308.
- Jones, R. N., Mendes, R. E., Sader, H. S. (2010). Ceftaroline activity against pathogens associated with skin and skin structure infections: results from an international surveillance study, *J Antimicrob Chemother*, 65(4), 17-31.
- Juan, C., Moyá, B., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2006). Stepwise Upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosomal Cephalosporinase Conferring High-Level β -Lactam Resistance Involves Three AmpD Homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1780–1787.
- Kaplinski, L., Lepamets, M., & Remm, M. (2015). GenomeTester4: a toolkit for performing basic set operations - union, intersection and complement on k-mer lists. *GigaScience*, 4, 58.
- Kojima, S., & Nikaido, H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2629–E2634.
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., & Pechère, J.-C. (1999). Characterization of MexT, the Regulator of the MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6300–6305.
- Köser, C. U., M. Bryant, J., Becq, J., Török, M. E., Ellington, M. J., Marti-Renom, M. A., ... Peacock, S. J. (2013). Whole-Genome Sequencing for Rapid Susceptibility Testing of *M. tuberculosis*. *The New England Journal of Medicine*, 369(3), 10.1056/NEJMc1215305.
- Köser, C. U., Ellington, M. J., & Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics*, 30(9), 401–407.
- LaBaer, J., Qiu, Q., Anumanthan, A., Mar, W., Zuo, D., Murthy, T. V. S., ... Brizuela, L. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Gene Collection. *Genome Research*, 14(10b), 2190–2200.
- Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K., Kim, B. S. (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Antimicrob Agents*, 25(4), 290-5.
- Ledeboer, N. A., & Hodinka, R. L. (2011). Molecular Detection of Resistance Determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9 Suppl), S20–S24.

- Lee, R. S., & Behr, M. A. (2016). The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(2), 47–62.
- Lees, J. A., Vehkala, M., Välimäki, N., Harris, S. R., Chewapreecha, C., Croucher, N. J., ... Corander, J. (2016). Sequence element enrichment analysis to determine the genetic basis of bacterial phenotypes. *Nature Communications*, 7, 12797.
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 302(2).
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., ... , Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect Dis*, 16(2), 161-8.
- Manson, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12269–12274.
- Martinen, P., Hanage, W. P., Croucher, N. J., Connor, T. R., Harris, S. R., Bentley, S. D., & Corander, J. (2012). Detection of recombination events in bacterial genomes from large population samples. *Nucleic Acids Research*, 40(1), e6.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., & Nishino, T. (1999). Interplay between Chromosomal β -Lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 400–402.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3322–3327.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., & Frère, J. M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochemical Journal*, 330(Pt 2), 581–598.
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., ... Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4420–4421.
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 727–737.
- Monti, M. R., Morero, N. R., Miguel, V., & Argaraña, C. E. (2013). *nfxB* as a Novel Target for Analysis of Mutation Spectra in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(6), e66236.

- Mosquera-Rendón, J., Rada-Bravo, A. M., Cárdenas-Brito, S., Corredor, M., Restrepo-Pineda, E., & Benítez-Páez, A. (2016). Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* species. *BMC Genomics*, 17, 45.
- Moya, B., Dötsch, A., Juan, C., Blázquez, J., Zamorano, L., Haussler, S., & Oliver, A. (2009). β -Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000353.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Nation, R. L., & Li, J. (2009). Colistin in the 21st Century. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(6), 535–543.
- Nouri, R., Ahangarzadeh Rezaee, M., Hasani, A., Aghazadeh, M., & Asgharzadeh, M. (2016). The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 925–930.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 382–402.
- Pirnay, J. P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P., Zizi, M. (2002). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates, *Environ Microbiol*, 4(12), 872-82.
- Pogliano, J., Pogliano, N., & Silverman, J. A. (2012). Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4494–4504.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 479–487.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z., Nishino, T. (1996). Overexpression of the MexC-MexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol Microbiol*, 21(4), 713-24.
- Purssell, A., Poole, K. (2013). Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 159(Pt 10), 2058-73.
- Quinn, J.P., Dudek, E.J., DiVincenzo, C.A., Lucks, D.A., Lerner, S.A. (1986). Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*, 154(2), 289-94.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 13(6), 151–171.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 117(6), A244–A250.
- Russell, A.D. (2000). Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol*, 52(2), 227-33.

- Saito, K., Yoneyama, H., Nakae, T. (1999). nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome, *FEMS Microbiol Lett*, 179(1), 67-72.
- Salisbury, S. M., Sabatini, L. M., Spiegel, C. A. (1997). Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay, *Am J Clin Pathol*, 107(3), 368-73.
- Samraoui, B., Sutton, B. J., Todd, R. J., Artymiuk, P. J., Waley, S. G., Phillips, D. C. (1986). Tertiary structural similarity between a class A [beta]-lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase, *Nature*, (320), 378-380.
- Schmidtke, A. J., & Hanson, N. D. (2008). Role of *ampD* Homologs in Overproduction of AmpC in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3922–3927.
- Sennhauser, G., Bukowska, M.A., Briand, C., Grüttler, M.G. (2009). Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Mol Biol*, 389(1), 134-45.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Danish Rizvi, S. M., & Kamal, M. A. (2015). Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 62–64.
- Smaill, F. (2000). Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview, *Can J Gastroenterol*, 14(10), 871-5.
- Sobel, M. L., Neshat, S., & Poole, K. (2005). Mutations in PA2491 (*mexS*) Promote MexT-Dependent *mexEF-oprN* Expression and Multidrug Resistance in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1246–1253.
- Sonnenburg, S., Zien, A., Philips, P., & Rätsch, G. (2008). POIMs: positional oligomer importance matrices—understanding support vector machine-based signal detectors. *Bioinformatics*, 24(13), i6–i14.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
- Stamper, P. D., Cai, M., Lema, C., Eskey, K., & Carroll, K. C. (2007). Comparison of the BD GeneOhm VanR Assay to Culture for Identification of Vancomycin-Resistant Enterococci in Rectal and Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3360–3365.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... , Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406(6799), 959-64.
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biology*, 15(11), 524.
- Zhao, Q., Li, X.-Z., Srikumar, R., & Poole, K. (1998). Contribution of Outer Membrane Efflux Protein OprM to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Independent of MexAB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), 1682–1688.
- Taniguchi, H., Aramaki, H., Nikaido, Y., Mizuguchi, Y., Nakamura, M., Koga, T., Yoshida, S. (1996). *FEMS Microbiol Lett*, 144(1), 103-8.

- Teixeira, B., Rodolfo, H., Carreño, N., Guzmán, M., Salazar, E., & Donato, M. D. (2016). aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cumana, Venezuela. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 13.
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., ... Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13950–13955.
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005). Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 118–125.
- Tran, T. T., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2015). Mechanisms of Drug Resistance: Daptomycin Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 32–53.
- Tran, T. T., Panesso, D., Mishra, N. N., Mileykovskaya, E., Guan, Z., Munita, J. M., ... Arias, C. A. (2013). Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Diverts the Antibiotic Molecule from the Division Septum and Remodels Cell Membrane Phospholipids. *mBio*, 4(4), e00281–13.
- Trias, J., & Nikaido, H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(1), 52–57.
- Van Belkum, A., & Dunne, W. M. (2013). Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2018–2024. <http://doi.org/10.1128/JCM.00313-13>
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- Verchere, A., Dezi, M., Adrien, V., Broutin, I., Picard, M. (2015). In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*, *Nat Commun*, 6:6890.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 577–585.
- Welch, B. L. (1947). The generalisation of student's problems when several different population variances are involved, *Biometrika*, 34(1-2), 28-35.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E., (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat Protoc*, 3(2), 163-75.
- Wolter, D. J., Khalaf, N., Robledo, I. E., Vázquez, G. J., Santé, M. I., Aquino, E. E., ... Hanson, N. D. (2009). Surveillance of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -Lactamases . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1660–1664.
- Yamane, K., Doi, Y., Yokoyama, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., ... Arakawa, Y. (2004). Genetic Environments of the *rmtA* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2069–2074.
- Yang, X., Xing, B., Liang, C., Ye, Z., & Zhang, Y. (2015). Prevalence and fluoroquinolone resistance of *pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 1386–1390.

Yoneyama, H., & Nakae, T. (1993). Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(11), 2385–2390.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

European Centre for Disease Prevention Control/European Medicines Agency Joint Working Group (ECDC/EMA). (2009). The Bacterial Challenge: Time to React. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf [kasutatud 02. jaanuar 2017]

Fleming, A. (1945). Nobel Lecture. Nobel e-Museum. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html> [kasutatud 30. detsember 2016]

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> [kasutatud 07. veebruar 2017]

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist*. <http://amr-review.org/Publications>. [kasutatud 04. jaanuar 2017]

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2017). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0. <http://www.eucast.org> [kasutatud 07. veebruar 2017]

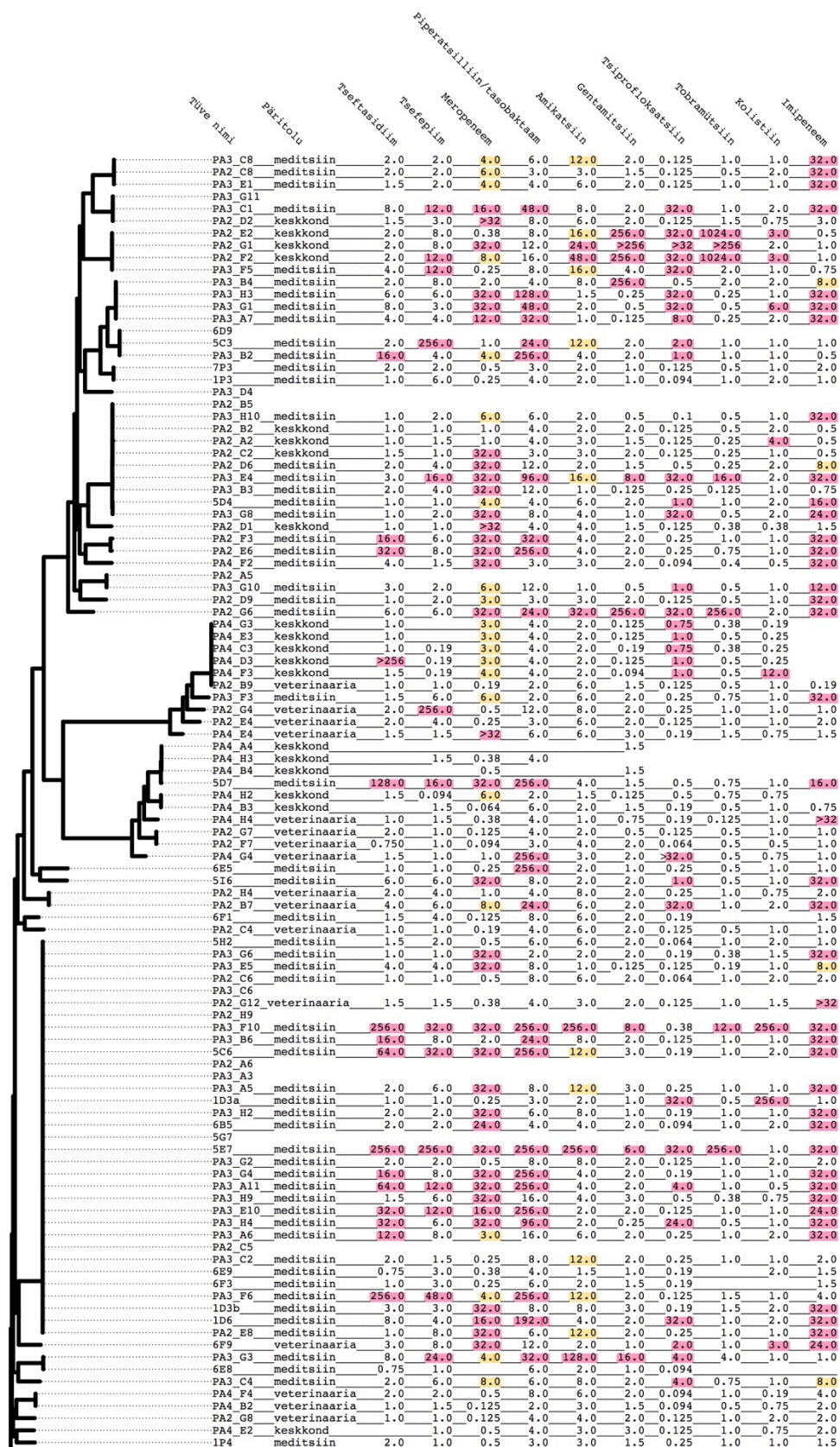
Seemann, T. (2014). Bng-tools. <https://github.com/tseemann/bng-tools> [kasutatud 27. aprill 2017]

World Health Organization. (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva: WHO. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf [kasutatud 30. detsember 2016].

World Health Organization. (2016). Antimicrobial resistance: Factsheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> [kasutatud 4. veebruar 2017]

World Health Organization. (2017). Drug resistance: Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/ [kasutatud 13. märts 2017]

LISA 1 Fülogeneetiline puu



PA2 E9	meditsiin	1.0	2.0	2.0	1.5	3.0	2.0	32.0	0.5	2.0	32.0
PA3 C3	meditsiin	2.0	8.0	2.0	24.0	3.0	12.0	6.0	3.0	1.0	2.0
PA3 D1	meditsiin	1.0	8.0	4.0	32.0	4.0	24.0	4.0	2.0	1.0	16.0
PA2 H3	meditsiin	6.0	16.0	8.0	64.0	16.0	256.0	32.0	4.0	1.0	2.0
PA3 H7	meditsiin	2.0	256.0	1.5	96.0	12.0	48.0	12.0	3.0	1.0	4.0
PA3 D3	meditsiin	2.0	8.0	2.0	32.0	8.0	64.0	16.0	2.0	1.0	2.0
PA3 D2	meditsiin	2.0	16.0	1.5	256.0	8.0	32.0	32.0	4.0	1.0	1.0
PA3 G9	meditsiin	24.0	16.0	0.75	256.0	3.0	256.0	16.0	3.0	0.75	1.5
6B1	meditsiin	2.0	16.0	1.5	256.0	4.0	24.0	16.0	4.0	1.0	1.5
PA3 B7	meditsiin	1.5	4.0	8.0	16.0	8.0	2.0	8.0	1.0	3.0	32.0
PA2 G3	meditsiin	256.0	32.0	32.0	256.0	12.0	2.0	0.125	1.0	2.0	32.0
PA2 A8	meditsiin	64.0	16.0	8.0	256.0	16.0	2.0	0.25	2.0	2.0	32.0
PA2 E3	meditsiin	8.0	8.0	32.0	24.0	12.0	2.0	0.38	1.0	0.5	32.0
5B9	meditsiin	1.5	2.0	4.0	4.0	8.0	2.0	0.125	1.0	1.0	32.0
PA3 G7	meditsiin	256.0	32.0	0.75	256.0	6.0	1.0	32.0	0.5	2.0	2.0
PA3 D8	meditsiin	1.5	8.0	4.0	4.0	6.0	1.5	0.5	0.5	1.0	32.0
6D1											
6E7	meditsiin	12.0	64.0	32.0	256.0	256.0	256.0	12.0	48.0	0.5	32.0
PA3 C7	meditsiin	2.0	8.0	1.0	8.0	16.0	256.0	32.0	256.0	2.0	2.0
PA3 A2	meditsiin	1.5	2.0	0.25	256.0	8.0	256.0	32.0	32.0	2.0	2.0
PA3 F7	meditsiin	1.0	2.0	0.5	12.0	6.0	256.0	32.0	12.0	1.0	4.0
PA3 D11											
PA2 F12	meditsiin	256.0	48.0	32.0	32.0	16.0	256.0	32.0	256.0	2.0	32.0
PA2 E12											
PA2 E1	keskkond	1.0	1.5	0.25	4.0	4.0	2.0	0.19	2.0	2.0	1.0
PA3 F3											
6D6											
PA2 C3	veterinaaria	1.0	2.0	3.0	2.0	4.0	1.0	0.094	0.5	1.0	16.0
PA2 F1	keskkond	1.0	1.5	0.19	256.0	6.0	2.0	0.19	1.0	1.0	1.0
7D2	meditsiin	12.0	6.0	0.25	32.0	2.0	1.0	32.0	0.5	1.0	1.0
7D1	meditsiin	16.0	8.0	32.0	48.0	2.0	1.0	32.0	0.25	2.0	32.0
1D4	meditsiin	12.0	8.0	0.125	32.0	2.0	1.0	0.064	0.5	256.0	1.0
PA3 B1	meditsiin	12.0	6.0	0.25	32.0	2.0	1.0	32.0	0.5	1.0	1.0
PA3 A1	meditsiin	16.0	8.0	32.0	48.0	2.0	1.0	32.0	0.25	2.0	32.0
PA2 A7	veterinaaria	1.5	2.0	0.75	6.0	6.0	3.0	0.19	0.75	1.0	4.0
PA2 H12	veterinaaria	1.5	1.5	0.125	3.0	8.0	2.0	0.125	1.0	0.8	1.5
PA4 E1	veterinaaria	1.5	1.5	0.19	3.0	4.0	2.0	0.19	1.0	0.5	1.5
PA2 H6	veterinaaria	2.0	2.0	0.5	4.0	4.0	2.0	0.125	1.0	2.0	2.0
6F7	veterinaaria	2.0	4.0	0.75	6.0	4.0	2.0	0.25	1.0	1.0	1.0
PA3 F4	meditsiin	12.0	8.0	32.0	96.0	4.0	2.0	0.125	1.0	1.0	32.0
PA2 A9	veterinaaria	1.0	2.0	0.25	6.0	8.0	2.0	0.19	0.75	2.0	1.0
PA3 B5	meditsiin	4.0	4.0	32.0	8.0	12.0	2.0	0.125	1.0	1.0	32.0
PA2 A1	veterinaaria	1.0	1.5	0.32	3.0	1.5	3.0	0.19	6.0	1.0	0.75
PA3 D6	meditsiin	1.0	1.0	0.38	1.5	2.0	1.0	1.0	0.38	1.0	6.0
PA2 F6	meditsiin	2.0	1.0	0.5	4.0	3.0	2.0	0.125	0.5	1.0	2.0
5F7	meditsiin	8.0	12.0	32.0	32.0	6.0	2.0	0.75	1.0	1.0	12.0
PA2 B10	veterinaaria	2.0	3.0	0.5	4.0	6.0	1.0	0.125	0.5	1.0	1.0
PA2 C10	veterinaaria	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	2.0	32.0	6.0	1.0	1.0
PA2 A10	meditsiin	1.5	4.0	1.0	0.5	3.0	2.0	0.125	0.5	1.0	32.0
1C9	meditsiin	1.0	2.0	0.125	2.0	3.0	1.0	0.25	0.5	1.0	1.0
PA2 G9											
PA3 A10	meditsiin	1.0	1.0	0.125	4.0	4.0	2.0	0.064	0.5	1.0	0.75
6G1	veterinaaria	1.0	1.0	0.125	4.0	2.0	1.0	0.125	0.5	256.0	1.0
PA2 H1	keskkond	2.0	2.0	0.125	4.0	6.0	4.0	0.125	0.5	1.5	1.0
6F2	meditsiin	1.0	2.0	0.19	4.0	1.5	1.0	0.094			1.0
PA2 F8	veterinaaria	2.0	2.0	0.125	6.0	4.0	1.5	0.125	1.0	1.0	1.5
PA4 F1	veterinaaria	1.5	1.5	0.125	4.0	3.0	1.5	0.125	0.38	0.5	1.5
PA4 D1	veterinaaria	1.5	1.0	0.32	6.0	6.0	2.0	0.19	1.0	0.5	1.5
PA4 D5											
PA4 C5											
PA2 F9	meditsiin	32.0	256.0	24.0	256.0	256.0	256.0	32.0	16.0	2.0	32.0
PA4 B5											
PA2 H5											
PA3 B10	meditsiin	0.75	1.0	0.19	4.0	2.0	1.0	0.094	0.25	2.0	1.5
PA3 E2											
PA3 E6											
PA2 G5											
6B9	meditsiin	2.0	2.0	0.75	8.0	4.0	2.0	16.0	1.0	2.0	2.0
PA2 B1	veterinaaria	2.0	3.0	0.5	4.0	12.0	3.0	0.125	1.5	1.0	2.0
PA3 E8	meditsiin	3.0	36.0	32.0	32.0	6.0	2.0	0.5	0.5	1.5	32.0
PA4 C2	veterinaaria	256.0	8.0	0.32	12.0	8.0	3.0	1.0	1.5	0.38	3.0
PA3 F8	meditsiin	8.0	3.0	2.0	256.0	6.0	1.5	16.0	0.25	0.38	6.0
PA3 E11											
6A1	meditsiin	4.0	4.0	32.0	12.0	8.0	2.0	32.0	1.0	2.0	32.0
PA2 E7	meditsiin	256.0	64.0	32.0	256.0	8.0	2.0	0.5	1.0	2.0	32.0
5H6	meditsiin	4.0	12.0	32.0	16.0	4.0	2.0	1.5	1.0	1.5	32.0
6D7											
5B7	meditsiin	256.0	32.0	32.0	256.0	48.0	8.0	1.0	2.0	1.0	32.0
PA2 F5											
PA3 D10	meditsiin	2.0	2.0	0.25	24.0	4.0	2.0	0.125	1.0	2.0	1.5
PA3 H5	meditsiin	12.0	16.0	12.0	32.0	2.0	2.0	1.0	0.5	1.0	8.0
PA4 D4	veterinaaria	1.0	1.5	0.19	4.0	3.0	1.5	0.125	0.75	1.0	1.5
PA4 G2	veterinaaria	1.0	1.0	0.094	2.0	3.0	1.5	0.125	0.25	0.5	1.5
PA2 B4	veterinaaria	2.0	1.5	0.25	6.0	8.0	3.0	0.094	1.0	4.0	1.0
PA4 C1	veterinaaria	1.5	1.5	0.3	6.0	6.0	2.0	0.2	1.0	0.5	1.5
PA3 D5	meditsiin	256.0	256.0	4.0	16.0	25.0	4.0	32.0	8.0	256.0	4.0
PA4 H1	veterinaaria	2.0	1.5	0.19	6.0	6.0	2.0	0.19	0.5	1.0	1.5
6B7	meditsiin	1.0	0.5	4.0	1.0	4.0	1.5	2.0	0.75	1.0	1.0
PA2 B6											
5I3	meditsiin	32.0	12.0	16.0	256.0	96.0	4.0	32.0	48.0	1.0	4.0
PA3 H8	meditsiin	24.0	8.0	8.0	48.0	1.0	0.125	12.0	0.125	2.0	12.0
6F4	meditsiin	0.5	1.0	0.5	2.0	0.75	0.75	0.064		1.0	2.0
6G5	veterinaaria	2.0	1.0	0.19	4.0	4.0	2.0	0.125	0.5	1.0	1.5
6G2	veterinaaria	0.38	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.064	0.5	1.0	4.0
PA3 H11	veterinaaria	1.0	2.0	1.5	3.0	4.0	2.0	0.19	1.0	0.75	8.0
PA2 A4	veterinaaria	2.0	2.0	1.0	8.0	8.0	2.0	0.125	1.0	2.0	2.0
PA4 C4											
PA4 A1	meditsiin	1.5	1.0	0.5	3.0	4.0	2.0	0.064	0.38	1.0	1.5
PA2 H8	veterinaaria	1.5	2.0	0.25	3.0	6.0	2.0	0.125	0.5	1.0	1.0
PA3 A9	meditsiin	2.0	2.0	32.0	3.0	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0	32.0
PA2 C9											
6D8											
PA4 A2	veterinaaria	1.0	0.75	0.19	4.0	6.0	2.0	0.125	0.5	1.0	0.75
PA4 A5	veterinaaria	1.0	1.0	0.032	2.0	4.0	1.5	0.125	0.75	0.75	1.0
PA3 F11											
PA3 F1	meditsiin	1.0	0.75	4.0	2.0	2.0	1.0	0.125	0.25	1.0	32.0
PA2 D4	veterinaaria	2.0	3.0	12.0	8.0	2.0	0.047	1.0	1.0	2.0	
7D1	meditsiin	0.5	0.5	0.25	256.0	2.0	0.75	0.125	0.5	1.0	2.0
PA3 A4	meditsiin	48.0	1.5	32.0	256.0	1.5	0.75	0.064	0.5	0.38	16.0
PA4 G1	veterinaaria	256.0	12.0	0.75	6.0	96.0	24.0	0.32	8.0	256.0	2.0
PA4 B1											
PA2 D10	veterinaaria	2.0	6.0	0.094	4.0	8.0	4.0	2.0	1.0	1.0	2.0
PA4 D2	veterinaaria	256.0	6.0	1.5	6.0	8.0	3.0	0.38	1.5	2.0	2.0
PA3 A8	meditsiin	8.0	8.0	32.0	32.0	4.0	2.0	2.0	0.5	1.0	6.0
PA2 E7	veterinaaria	1.5	6.0	0.5	2.0	8.0	2.0	0.19	1.0	1.0	1.0
PA2 A3	veterinaaria	2.0	1.0	0.75	2.0	3.0	1.0	0.125	1.0	1.0	1.0
PA2 D7	veterinaaria	1.0	4.0	0.5	4.0	6.0	2.0	0.5	0.5	1.0	1.5
PA2 B3	veterinaaria	1.0	2.0	0.5	2.0	4.0	2.0	0.19	0.5	1.0	1.0
PA2 D3	veterinaaria	2.0	4.0	1.0	3.0	4.0	2.0	0.19	1.0	2.0	1.0
PA2 C7	veterinaaria	1.0	4.0	1.0	2.0	6.0	2.0	0.25	1.0	1.0	1.0
PA2 F4	veterinaaria	12.0	16.0	32.0	24.0	8.0	2.0	32.0	1.0	1.0	32.0
PA2 B8	meditsiin	4.0	6.0	32.0	24.0	4.0	2.0	0.5	0.5	2.0	32.0
6E1											
PA3 B8	meditsiin	1.0	4.0	8.0	2.0	3.0	2.0	0.38	1.0	2.0	32.0
PA3 C9	meditsiin	1.5	4.0	4.0	2.0	4.0	2.0	0.5	0.5	2.0	32.0

Joonis 15. Tuumgenoomil põhinev *P. aeruginosa* tüvede fülogeneetiline puu. Välimiste sõlmede juurde on märgitud tüvede nimetused, nende päritolu ja MIC väärtused erinevatele antibiootikumidele (mg/l). Roosa taust - vastava antibiootikumi suhtes resistentne tüvi. Kollane taust - vastava antibiootikumi suhtes keskmiselt resistentne tüvi (vastavalt EUCAST murdepunktidele (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)).

LIHTLITSENTS

Mina, Erki Aun (sünnikuupäev: 17.11.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

K-meeridel põhinev antibiootikumiresistentsuse markerite tuvastamine bakteris *Pseudomonas aeruginosa*,

mille juhendaja on Age Brauer,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2016